

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
ZAINAB FAKIH

ANALYSE PROTÉOMIQUE NUCLÉAIRE COMPARATIVE  
CHEZ *ARABIDOPSIS* LORS DE LA RÉPONSE AU CHITOSANE

DÉCEMBRE 2015

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je profite de cette page pour remercier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin pour réaliser ce travail; je cite particulièrement :

Monsieur le professeur Hugo Germain, mon directeur de recherche, qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui a accepté d'être directeur de mon stage. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a témoignée durant cette épreuve et pour tout ce qu'il a fait pour que ce travail arrive à son terme. Je le remercie pour sa disponibilité, pour son aide et surtout de m'avoir appris son savoir-faire en biologie moléculaire.

Toute ma reconnaissance et gratitude à madame Mélodie B. Plourde, professionnelle de recherche, qui m'a soutenue tout au long de cette épreuve. Je la remercie pour sa compréhension, sa gentillesse, ses conseils et surtout ses encouragements.

Je remercie également tous les autres membres de l'équipe, actuels ou passés, qui m'ont apporté une aide aussi bien scientifique que morale quand le besoin s'en faisait sentir. Merci aussi à tous les stagiaires pour le « sang neuf » : « Je sers la science et c'est ma joie » (le disciple, Léonard).

Je remercie du fond de mon cœur, mesdames les professeures Carole Lavoie et Isabel Desgagné-Penix, de l'Université du Québec à Trois-Rivières, d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Enfin, je remercie ma petite famille : « Khalil, Ali, Sarah et mon petit bébé Hadi » pour le soutien morale, l'encouragement. Merci à toi Khalil, parce que tu es toujours à coté de moi dans le passage de ma maîtrise, pour la lecture de mémoire et la correction de certains fautes d'orthographe.

## AVANT-PROPOS

Les travaux présentés ici ont été réalisés au laboratoire de recherche « Immunité végétale : génomique fonctionnelle des pathosystèmes », dirigés par le professeur Hugo Germain, à l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Parce qu'ils sont capables d'évoluer pour déjouer les défenses de leurs hôtes, les phytopathogènes font peser une menace permanente sur des cultures essentielles pour l'homme, telles le chancre bactérien des agrumes dû à *Xanthomonas citri subsp. citri* qui a entraîné la perte de millions d'arbres aux États-Unis et au Brésil, ou la maladie de Pierce due à *Xylella fastidiosa* qui entrave la culture de la vigne dans certaines régions des États-Unis. Pour protéger les plantes contre les maladies, il importe donc de bien connaître les mécanismes généraux du système immunitaire inné des plantes induit par les phytopathogènes.

C'est pour contribuer à cette connaissance que nous avons choisi d'étudier les changements au niveau nucléaire chez la plante conduisant à la réponse immunitaire innée suite au traitement au chitosane.

## RESUMÉ

Les plantes sont fréquemment soumises à des agressions par des agents phytopathogènes. Pour lutter contre ces agresseurs, elles ont dû développer des mécanismes de défense. Ces mécanismes complexes sont activés par la plante après reconnaissance de l'agent pathogène. Il s'établit alors un dialogue moléculaire entre la plante et son agresseur, dont l'issue détermine le type de relation entre la plante et l'agent pathogène : résistance ou maladie. L'induction de la défense est médiée par la détection de MAMP ou PAMP (Microbe or Pathogen Associated Molecular Pattern) comme la flagelline et la chitine, ce qui amène à la réponse MTI (Microbe Triggered-Immunity).

Le chitosane,  $\beta$ -1,4- glucosamine, est la forme déacétylée de chitine. Il est un composé principal des parois des agents fongiques, et il joue un rôle dans l'induction de la défense contre les pathogènes chez plusieurs espèces de plantes. Bien que le rôle du chitosane dans le processus physiologique et métabolique a été décrit, la reprogrammation nucléaire due au chitosane est encore largement inconnue. Peu de choses sont connues sur les mécanismes par lesquels les plantes peuvent reconnaître le chitosane et il n'est pas clair si le récepteur de la chitine CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase) est requis dans la perception du chitosane. Il a été démontré que le chitosane peut se lier faiblement à CERK1 (Petutsching *et al.*, 2010).

Dans cette étude, nous avons cherché à découvrir les composants protéiques qui participent au MTI (MAMP-Triggered Immunity) en utilisant une approche indépendante de phénotype et qui nous permettait d'identifier les protéines qui se relocalisent vers le noyau suite à l'induction de PTI (PAMP Triggered-Immunity) par le chitosane. Nous rapportons sur le protéome nucléaire de la plante *Arabidopsis* Columbia-0 (type sauvage) et de *cerk1* (*chitin elicitor receptor kinase*) mutée, 15 min après l'induction de la MTI par le chitosane. Notre approche a révélé que la plante mutée *cerk1* traitée par le MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern) montre beaucoup de protéines communes avec la plante *Arabidopsis* Col-0 traitée avec du chitosane. La plante *cerk1* montre également plusieurs protéines uniques, qui sont absents de Col-0 traité par le chitosane. Une analyse détaillée des protéines identifiées montre qu'il y a une accumulation nucléaire des enzymes de modification de l'ADN, des protéines de liaison à l'ARN et de certaines protéines ribosomales. Aucune nouvelle MAPK n'a été identifiée, mais RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) qui est une protéine de type « scaffold » impliquée dans la défense et une TIR-NB-LRR impliquée dans la résistance à *Leptosphaeria maculans* ont été identifiés.

**Mots-clés :** MAMP, MTI, chitosane, protéome, noyau, MAPK, *Arabidopsis thaliana*.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	II
AVANT-PROPOS .....	III
RESUMÉ.....	IV
LISTE DES FIGURES .....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	IX
CHAPITRE I .....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les défis dans le domaine de l'agriculture .....	2
1.1.1 Urbanisation croissante.....	2
1.1.2 Changement des habitudes alimentaires.....	3
1.1.3 Problèmes rencontrés chez les végétaux.....	4
1.1.3.1 Stress abiotique chez les plantes.....	4
1.1.3.2 Stress biotique chez les plantes.....	5
1.2 Solutions envisagées.....	6
1.2.1 Pesticides .....	6
1.2.2 Organisme génétiquement modifié (OGM).....	7
1.2.3 Stimulation des défenses naturelles (SDN) .....	9
1.2.3.1 Principe des SDN.....	10
1.2.3.2 Un exemple de SDN : le chitosane .....	16
1.3 Problématique .....	25
1.4 Objectifs.....	27
CHAPITRE II .....	28
UNBIASED NUCLEAR PROTEOMIC APPROACH USING CHITOSAN TREATED <i>ARABIDOPSIS</i> PLANTS REVEALS NUCLEAR PROTEIN COMPONENT THAT PARTICIPATE IN MAMP-TRIGGERRED IMMUNITY.....	28
2.1 Contribution des auteurs .....	28
2.2 Résumé en français .....	28

2.3 Article scientifique.....	30
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>45</b>
<b>SUPPLEMENTARY INFORMATION.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAPHY .....</b>	<b>56</b>
<b>CHAPITRE III.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>60</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>64</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Croissance et estimation de la population mondiale de 1910 à 2050 (en milliards) (Source FAO) .....	1
1.2	Les stress biotiques et abiotiques chez les plantes.....	6
1.3	le mécanisme générale de défense chez les plantes.....	12
1.4	Les différentes étapes de la stratégie défensive de la plante.....	15
1.5	Structure chimique de la chitine et du chitosane .....	18
1.6	Les différentes réponses de défense induites par le traitement au chitosane (Source : Iriti <i>et al.</i> , 2009).....	21



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Consommation des différents produits en kg par personne par an entre 1950 et 2008 (Source : Statistiques Canada) .....	3
1.2	Les réponses de défenses induites par le chitosane <i>Arabidopsis thaliana</i> (Reproduit de Iriti <i>et al.</i> , 2009) .....	20
1.3	Les principaux pathogènes inhibés par le chitosane (Source : Allan et Hadwiger, 1979) .....	23

## LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

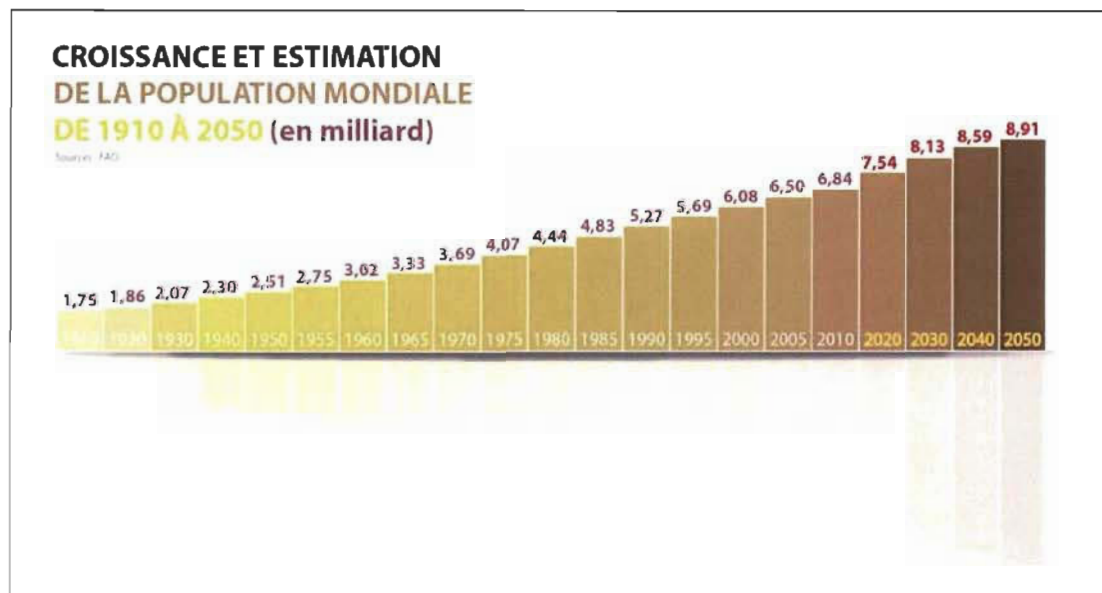
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BT	<i>Bacillus Thuringiensis</i>
CC	Coiled Coil, Domaine superhélice des protéines R
CERK1	Chitin Elicited Receptor Kinase 1
ERE	Ethylen Responsive Element
ETI	Réaction de défense végétale déclenchée suite à la reconnaissance des Avr par les protéines R (« Effector-triggered immunity »)
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
GFP	Green Fluorescent Protein
HR	Réaction hypersensible (« hypersensitive response »)
H3	Marqueur utilisé pour détecter l'histone nucléaire (« Histone 3 »)
HSP 70	Marqueur utilisé pour détecter les protéines cytoplasmiques (« Heat Shock Protein 70 »)
LAR	Réponse de la résistance dans une partie identifiée chez la plante qui se produit après une exposition à un agent pathogène (« localised Acquired Resistance »)
LC-MS-MS	Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
<i>Leptosphaeria maculans</i> un champignon phytopathogène hémibiotrophe, qui cause une pathologie appelée nécrose du collet sur les plantes de la famille des Brassicaceae, qui inclut la navette, la moutarde noire, le chou.	
LRR	Domaine composé de motifs répétés riches en leucine, présent dans les protéines R (« Leucine-rich repeat »)
MAPK	Protéine Kinase (« Mitogen- Activated Protein Kinases »)
MS	Spectrométrie de masse (« Mass spectrometry »)
NB	Domaine de liaison aux nucléotides présent dans les protéines R (« Nucleotide-Binding »)

OGM	Organisme Génétiquement modifié
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PR	Pathogenesis Related Proteins
PRR	Récepteur végétale à domaine extracellulaire reconnaissant un PAMP/MAMP (« Pattern recognition receptor »)
PTI	Réaction de défense végétale déclenchée par la reconnaissance des PAMP/MAMP par les PRR (« Pathogen – triggered Immunity »)
ROS	Espèce réactive de l’oxygène (« Reactive Oxygen Species »)
RT-PCR	Real Time- Polymerase Chain Reaction
SAR	Réponse de la résistance dans la plante entière qui se produit après une exposition à un agent pathogène (« Systemic acquired resistance »)
SDN	Molécule produite par un agent phytopathogène qui induit chez la plante une réponse immunitaire (« Stimulateur de défense naturel »)
TIR	Domaine récepteur Toll/interleukine-1 des protéines R (« Toll/interleukine-1 Receptor »)
ZF	Zinc Finger

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

Tout ce que l'homme mange est issu de la terre, et l'agriculture a toujours été un enjeu majeur pour l'humanité. La population mondiale est en constante augmentation : il y a 80 millions de naissances par an et nous sommes aujourd'hui 7 milliards d'habitants sur terre et il est estimé qu'un milliard de personnes souffrent de la faim dans le monde. Selon les démographes, nous serons 9 milliards en 2050 (Figure 1.1); comment réussirons-nous à nourrir 9 milliards de personnes en 2050? L'une des solutions proposées est de doubler la production agricole mondiale. Mais face à de nouvelles contraintes, les solutions qui ont permis d'augmenter la productivité de l'agriculture au XX<sup>e</sup> siècle (amélioration des cultivars, révolution verte, mécanisation, superficie des cultures, irrigation de masse) montrent actuellement leurs limites.



**Figure 1.1** Croissance et estimation de la population mondiale de 1910 à 2050 (en milliards) (Source FAO).

## 1.1 Les défis dans le domaine de l'agriculture

Entre la demande mondiale en pleine croissance, les rendements stagnants qui conduisent à des transferts vers de nouvelles espèces ainsi que la hausse des coûts de production, l'agriculture se trouve face à de nombreux défis.

### 1.1.1 Urbanisation croissante

Au cours des 40 prochaines années, un certain nombre de phénomènes viendront menacer la sécurité alimentaire mondiale. Il est estimé que la population mondiale, qui était de 6,9 milliards d'individus en 2010 (Nations Unies, 2009), passera à environ 9,2 milliards en 2050; elle augmentera essentiellement dans les régions les moins développées, les taux de croissance démographique les plus élevés se situant dans les pays les plus pauvres (Nations Unies, 2009). En 2050, 70 pour cent de la population vivra dans des villes, contre 50 pour cent à l'heure actuelle. Si la tendance se poursuit, cette urbanisation, additionnée à l'étalement urbain et conjuguée à l'augmentation des revenus dans les pays en développement, entraînera une augmentation de la consommation de viande, ce qui intensifiera la demande de céréales fourragères, parallèlement à une utilisation sans cesse accrue de denrées agricoles pour la production de biocarburants. D'ici 2020, les pays industrialisés pourraient consommer jusqu'à 150 kg de maïs par habitant par an en vue de la transformation en éthanol – à parité avec la consommation alimentaire de céréales dans les pays en développement (Rosegrant *et al.*, 2008), tandis qu' à l'heure actuelle, la consommation de maïs est de 76 kg par habitant (FAO).

Selon la FAO (Food and Agriculture Organisation), en comptant 0,4 km<sup>2</sup> pour les logements en infrastructures nécessaires à 1 000 personnes, la croissance démographique mondiale entre 1995 et 2030 devrait mobiliser à elle seule 1 millions d'hectares supplémentaires de terre à des fins non agricoles.

### 1.1.2 Changement des habitudes alimentaires

Les habitudes alimentaires des populations des pays riches demandent beaucoup de ressources et consomment beaucoup d'énergie. Au Canada, l'alimentation a beaucoup évolué depuis 50 ans. La consommation de viande a presque doublé (de 44 kg par an en 1950, elle est passée à 85 kg en 2007 et 93 kg en 2013 selon statistiques canada), alors que la consommation de céréales (pain) a été divisée environ par 3 et celle de certains légumes (notamment la pomme de terre) par 7 (Garriguet, 2008).

**Tableau 1.1**

Consommation des différents produits en kg par personne par an entre 1950 et 2008  
(Source : Statistiques Canada)

Produits	1950	2008
Fruits	38	58
Légumes	60	55
Viandes	44	85
Poissons	10	11
Fromages	5	10
Pain	121	42
Pomme de terre	153	22
Vin (en litre)	143	51

Au cours des dernières décennies, les populations des pays émergents disposant de revenus plus importants, comme l'Asie et l'Amérique latine, ont également augmenté leur consommation de viande de 5 à 6 % par an, alors que celle des pays pauvres, comme l'Afrique subsaharienne, le Proche-Orient et l'Afrique du Nord, n'a pas

augmenté. Or, ces évolutions des modes d'alimentation, s'ils sont en général synonyme de meilleure croissance et meilleure santé, ne sont pas sans impact sur l'environnement. Cette consommation de viande accrue augmente la consommation en eau potable, dioxyde de carbone, méthane et est très néfaste pour l'environnement.

### **1.1.3 Problèmes rencontrés chez les végétaux**

Les plantes sont constamment exposées à leur environnement et ne peuvent échapper aux situations stressantes. L'ensemble des facteurs stressants contribuant à faire souffrir la plante est qualifié respectivement de biotiques ou abiotiques (bios = vie en grec) selon qu'ils sont dus à des organismes vivants (insectes, virus et bactéries) ou à d'autres facteurs (sécheresse et manque de luminosité).

#### ***1.1.3.1 Stress abiotique chez les plantes***

Le stress abiotique est déclenché par : le gel, la chaleur, les chocs de températures, la salinité, le manque d'eau, le rayonnement solaire, les carences nutritives et le vent (Figure 1.2).

Le réchauffement planétaire actuel provoque des changements climatiques dont les conséquences se font déjà ressentir. Les phénomènes climatiques extrêmes comme les tempêtes et les ouragans sont de plus en plus fréquents; les températures augmentent et les précipitations sont de plus en plus irrégulières. Certaines régions connaissent une sécheresse qui rend la terre difficilement cultivable et les déserts s'étendent de façon irréversible. D'autres régions connaissent des périodes de pluies de plus en plus intenses causant des inondations, et détruisant les terres cultivées.

Le réchauffement planétaire entraîne également la fonte des glaciers et une augmentation du volume des océans. Cela a pour conséquence l'élévation du niveau de la mer qui s'est élevée de 12 cm depuis 1880. Il est estimé qu'il pourrait monter de 40 cm à 120 cm d'ici 2100, réduisant un peu plus la quantité de terres cultivables (selon FAO).

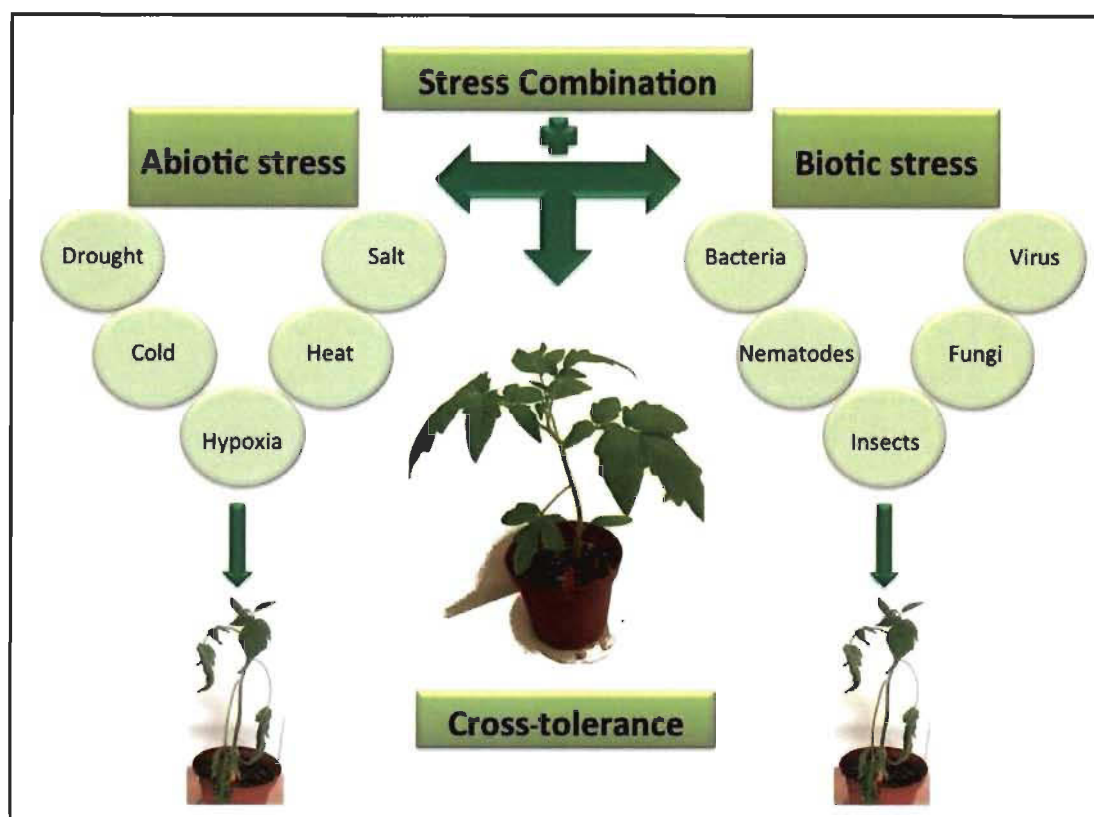
### 1.1.3.2 Stress biotique chez les plantes

Un stress biotique est un stress résultant de l'action néfaste d'un organisme vivant sur un autre organisme vivant telle qu'une attaque par un pathogène. Ces agents peuvent être des champignons, des bactéries, des virus, des nématodes, et des insectes (Figure 1.2). Ces pathogènes, en infectant les végétaux, vont affecter la croissance et le rendement et peuvent causer leur mort. Les maladies biotiques des plantes maraîchères incluent les bactéries, les virus et les champignons, et qui se développent à la faveur de conditions particulière (chaleur, humidité, insecte vecteur, et blessures) provoquant ainsi des pertes considérables de production variant selon le type de la culture. Comme tout stress, les maladies parasitaires affectent la croissance, la fertilité et la productivité des plantes.

Les maladies de la pomme de terre sont particulièrement connues. En fait, durant son cycle de développement, la pomme de terre est soumise à l'attaque de pathogènes diverses qui sont dues principalement à des champignons comme *Phytophthora infestans* l'agent causal du mildiou de la pomme de terre, des virus tels que le virus Y de la pomme de terre et des bactéries. *P. infestans* est responsable de la plus grande migration humaine causé par l'alimentation de l'ère moderne (Schumann et D'Arcy, 2015), des dizaines de milliers d'Irlandais affamés ayant fui leur pays lors de cette épidémie. Ce type de pathogènes, en infectant le feuillage, les racines et/ou les tubercules, provoquent des retards à la germination, l'affaiblissement des plantes, la mort prématurée et/ou la mauvaise qualité des tubercules.

Certaines infections peuvent apparaître ou continuer à se développer sur les tubercules pendant la période de conservation, ce qui entraîne une perte importante qui est estimée mondialement à presque 30 % (Rousselle *et al.*, 1996).





**Figure 1.2** Les stress biotiques et abiotiques chez les plantes.  
(Crédit photographique : Gravot, Université des Rennes, France).

## 1.2 Solutions envisagées

### 1.2.1 Pesticides

Le terme pesticide regroupe les substances chimiques destinées à repousser, détruire ou combattre les ravageurs et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages aux denrées alimentaires et aux produits agricoles. Environ 350 produits différents sous forme d'herbicide, insecticide, fongicide, nématicide, et autres, sont utilisés aux États-Unis de nos jours (selon FAO). Les pesticides sont utilisés dans le domaine agricole dans le but de :

- Protéger les cultures contre les organismes nuisibles,
- Assurer des récoltes régulières

- Maintenir la qualité des aliments. Par exemple, la protection fongicide, en complément des pratiques culturales, contribue à lutter contre les champignons dont certains produisent des mycotoxines extrêmement dangereuses pour la santé. Un autre exemple, le développement de *Datura* (mauvaise herbe) dans les cultures légumières peut conduire à la présence de graines toxiques.

Cependant, l'utilisation massive des pesticides pose des problèmes au niveau environnemental et au niveau de la santé :

- Risque de pollution de l'eau : l'eau est précieuse au quotidien. L'amélioration de la qualité des eaux est donc un enjeu majeur. Il faut limiter au maximum la probabilité de retrouver des traces de pesticides dans les nappes phréatiques ou les eaux superficielles.
- Risque de pollution de l'air : lorsqu'un pesticide est pulvérisé pour protéger une culture, une partie du produit peut se volatiliser (Al-Saleh, 1994). Inévitablement, avec cette infiltration dans les sols, et dans l'eau, l'homme est menacé. Les pesticides sont accusés de causer plusieurs maladies, comme l'asthme, la maladie de Parkinson, certains cancers et des malformations (Hoppin *et al.*, 2007; Rugbjerg *et al.*, 2011; Multigner *et al.*, 2010). Les pesticides sont également accusés d'être structurellement trop proches des hormones (comme le Manèbe qui a un effet sur le dérèglement de la thyroïde, notamment en inhibant la sécrétion de l'hormone Thyroxine ), de menacer le système nerveux et de réduire la fertilité (Mesnage *et al.*, 2014; Jamal, 1997; Olivia *et al.*, 2001; Greenlee *et al.*, 2003). De plus, ils sont retrouvés dans les tissus adipeux du cerveau, dans le sang, dans le lait maternel, dans le foie, dans le placenta, dans le sperme et dans le sang du cordon ombilical des êtres humains (Gatignol, 2007).

### 1.2.2 Organisme génétiquement modifié (OGM)

Un organisme génétiquement modifié, ou OGM est une désignation qui s'emploie pour un être vivant dont le génome a été délibérément modifié suite à une intervention

humaine, selon les techniques du génie génétique. Les plantes génétiquement modifiées les plus cultivées au monde sont le maïs et le soja. L'essentiel de ces cultures synthétise des molécules insecticides et/ou tolère de fortes doses de pesticides (Berlan, 2012). Elles sont conçues dans le but d'améliorer les rendements de production en limitant les pertes par les ravageurs ou la concurrence avec des plantes rivales. La principale technique de conception des OGM est la transgénèse, grâce à laquelle un ou plusieurs gènes d'intérêt sont introduits. On parle alors d'organismes transgéniques. Mais, les plantes génétiquement modifiées et cultivées en champs font l'objet de vives critiques de la part d'une partie de la population, et différentes actions de fauchage de plants OGM ont déjà fait l'objet de médiatisation. Plusieurs reproches sont adressés aux OGM. D'abord, la dissémination possible des gènes et la contamination des plantes voisines bien qu'ils soient généralement mâles stériles. Certains estiment que ces plantes pourraient avoir des impacts négatifs sur la santé. Il est aussi invoqué que les OGM pourraient être toxiques envers d'autres insectes « non ciblés ». Certains pourraient être des insectes qui ne sont pas considérés comme « ravageurs » et même bénéfiques pour l'écosystème, d'où leur nom d'insectes « utiles » par exemple: les abeilles, les papillons, les coccinelles... Aux États-Unis, une expérience a été réalisée sur le Monarque, papillon réputé d'Amérique du Nord. Les chenilles de ce papillon ont été nourries de feuilles recouvertes du pollen d'un maïs GM, le maïs Bt. Ce maïs produit donc un insecticide pour résister à la pyrale, une chenille qui s'attaque à la tige du maïs. Ces chenilles de papillon ont connu une croissance plus lente que la normale et on a vu la mortalité augmenter fortement. Il y a donc un certain « danger » pour les papillons (Tyler Flockhart, 2015). Comme montré dans le cas du maïs Bt, de nombreux insectes développent une résistance ou plus simplement une tolérance à l'insecticide produit par la plante GM (Tabashnik *et al.*, 2013). La capacité initiale de la plante GM n'a donc plus l'effet escompté, il faut donc que l'agriculteur utilise à nouveau des insecticides et cette fois-ci à dose plus importante, car l'insecte est devenu plus résistant.

### 1.2.3 Stimulation des défenses naturelles (SDN)

À l'instar du système immunitaire des animaux, les plantes possèdent un ensemble de mécanismes de défense (résistance induite), activé lorsque certaines molécules émises par les bio-agresseurs sont détectées par la plante (Dangl and Jones, 2001; Zipfel, 2009). La stimulation des défenses naturelles des végétaux cultivés consiste, selon un principe qui rappelle celui de la vaccination, à activer le système de défense des cultures de sorte qu'elles se trouvent en état de résistance au moment d'une éventuelle agression (Denoux *et al.*, 2008). Par ailleurs, comme la vaccination, cette protection n'est pas infinie dans le cas des plantes, elle s'estompe après environ deux semaines. Les molécules qui induisent cette résistance sont appelées « éliciteurs » ou « stimulateurs des défenses naturelles des plantes » (« SDN » ou « SDP »). Ce sont des molécules qui sont reconnues par les plantes soit comme le signal initial d'une agression, soit comme un signal d'alerte intervenant dans la cascade de signalisation. Le concept de « résistance induite » pour protéger les plantes par les stimulateurs des défenses naturelles (SDN) a été émis en 1975 (Albersheim *et al.*, 1975). Selon leurs natures, certains SDN restent dans le champ du biocontrôle (micro-organismes, substances naturelles) ; d'autres non. Il faut d'ailleurs signaler la présence sur le marché d'un certain nombre de produits revendiquant une action de stimulation des défenses des plantes, mais ne possédant pas d'homologation pour cet usage (de tels produits sont souvent homologués en tant que matières fertilisantes), si bien que leur efficacité n'est pas garantie et que leur usage comme produit phytosanitaire n'est pas autorisé. En pratique, les traitements à l'aide de SDN doivent être utilisés de façon préventive et renouvelés, car leur persistance est limitée. Il arrive de plus que les plantes ne soient pas réceptives au moment du traitement (notamment si elles sont soumises à des stress abiotiques). Au-delà d'une certaine pression parasitaire, un traitement chimique d'appoint en mélange ou dissocié est recommandé.

### 1.2.3.1 Principe des SDN

#### Les défenses naturelles des plantes

- Mécanismes généraux

##### Défense passive

Les plantes, au cours de leur évolution, ont mis en place des barrières protectrices contre les bioagresseurs : cuticule, paroi pectocellulosique, etc. Ces barrières mécaniques leur confèrent une résistance constitutive, notamment face aux agents pathogènes (Kauffmann *et al.*, 2001). Mais si ceux-ci réussissent à les franchir, ils rencontrent les mécanismes de défense active.

##### Défense active

Certains des mécanismes de défense active peuvent même être visibles à l'œil nu, c'est le cas de la réaction d'hypersensibilité (HR). La réaction HR est une réaction spécifique basée sur le concept gène-pour-gène de Flor, dans laquelle le produit du gène d'avirulence du pathogène est reconnu par le produit du gène de résistance de la plante (Flor, 1971). Cette réaction intense se manifeste par la mort de la cellule hôte qui, avant de s'autodétruire, aura émis des signaux d'alerte vers les cellules voisines pour créer une zone de résistance locale acquise (de l'anglais *local acquired resistance*, LAR). Il s'ensuit la synthèse de molécules de défense antimicrobienne à action directe ou indirecte. Ces premières lignes de défense sont très efficaces pour confiner le pathogène et retarder son invasion dans l'organisme. La propagation des signaux et la synthèse des molécules de défense peuvent se généraliser à la plante entière : il s'agit de la résistance systémique acquise (SAR). Ce type de résistance est certes moins intense, mais plus durable: la plante est préparée à une nouvelle attaque du pathogène ou d'un autre agresseur et pourra y répondre plus rapidement (Kauffmann *et al.*, 2001). Ces

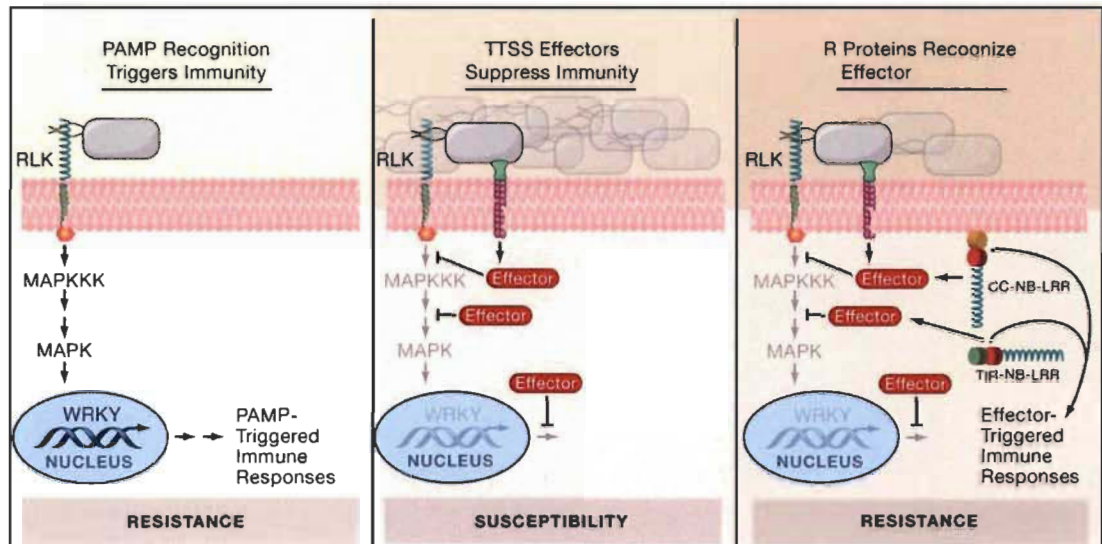
mécanismes de défense se décomposent grossièrement en trois phases : reconnaissance, signalisation puis réactions de défense.

- **Mécanismes moléculaires**

#### Reconnaissance de l'agent pathogène

La perception d'un agent pathogène implique la reconnaissance d'un éliciteur spécifique ou non spécifique (le terme éliciteur a pour origine étymologique le verbe anglais *to elicit* : provoquer).

La plante possède deux lignées de protéines pouvant induire la défense : une première constituée de récepteur de surface cellulaire de type récepteur kinase qui perçoivent de motifs conservés des pathogènes (Dangl et Jones, 2006). Ces motifs conservés sont appelés en anglais *pathogen associated molecular pattern* (ou PAMP). La réponse immunitaire engendrée par les récepteurs kinases qui perçoivent les PAMP est appelée PTI ou PAMP Triggered Immunity. Cette réponse est de faible intensité bien que généralement suffisante à contrer le pathogène. La seconde lignée de défense est intracellulaire et est constituée de protéines de résistance toujours constituées de domaines NB (nucleotide binding) et LRR (leucine rich repeat) ayant un domaine N-terminal CC (coil-coil) ou TIR (Toll Interleukin Receptor). Lorsque qu'activée suite à la reconnaissance d'un facteur de virulence du pathogène, ce sont ces protéines qui déclenchent la réponse hypersensible, celle que nous pouvons voir à l'œil nu caractérisée par des zones de nécroses (Figure 1.3) .Bien que ces deux types de protéines (de surface et intracellulaire) puissent activer la réponse de défense, seuls ceux reconnus par les récepteurs de surface cellulaire seront abordés en détail dans ce mémoire.



**Figure 1.3 : Le mécanisme générale de la réponse de défense chez les plantes.**

Les éliciteurs généraux, exogènes ou endogènes, sont de nature chimique variée (Kauffman *et al.*, 2001). Les éliciteurs exogènes sont des molécules provenant directement de l'agent pathogène (des PAMP), par exemple des  $\beta$ -glucanes ou la chitine issue de la paroi des champignons agresseurs (Kauffman *et al.*, 2001). Les éliciteurs endogènes sont des molécules issues de la plante elle-même; ils peuvent être libérés une fois que la cellule a été attaquée, notamment lors de la dégradation de la paroi cellulaire. Ce sont par exemple des fragments polysaccharidiques ou des oligogalacturonides provenant de la dégradation de la pectine (Pautot *et al.*, 1999). Les éliciteurs généraux activent la voie d'immunité PTI (PAMP Triggered immunity) (Aziz *et al.*, 2004). La réponse PTI déclenche une réponse en plusieurs temps.

#### La réponse précoce

Elle a lieu quelques minutes après la reconnaissance des éliciteurs. Cette réponse se manifeste séquentiellement par :

- des flux ioniques à travers la membrane plasmique (influx d'ions calcium et de protons, efflux d'ions potassium et chlorure);
- l'activation de protéines kinases, permettant des phosphorylations de protéines;



- l'activation des protéines G généralement associées à des récepteurs membranaires;
- la production de formes très réactives de l'oxygène (Ebel *et al.*, 1998; Klarzinsky *et al.*, 2001). Concernant ces formes réactives de l'oxygène, attardons-nous sur l'anion superoxyde  $O_2^-$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (qui est la forme la plus stable). Ceux-ci sont essentiellement produits par la NADPH oxydase, localisée sur la membrane des cellules végétales. Leur action dans le cadre d'une réponse précoce est directe : le  $H_2O_2$  inhibe la germination de spores de plusieurs champignons pathogènes.
- Les radicaux oxydants renforcent aussi la paroi végétale en polymérisant des protéines de la paroi végétale et provoquent la mort des cellules végétales en peroxydant les lipides de leur membrane (Kauffmann *et al.*, 2001). La réponse précoce est ensuite amplifiée par des réactions de défense proprement dites qui sont le plus souvent induites *via* une cascade de signalisation.

#### Voies de signalisation et réactions de défense locale intermédiaire

##### Épaississement de la paroi

Pour lutter contre l'action d'enzymes microbiennes digérant la paroi cellulaire végétale, la plante renforce sa paroi par diverses macromolécules qu'elle synthétise : protéines, polysaccharides ou polymères aromatiques (ressemblant à la lignine) (Kauffmann *et al.*, 2001). Or, la dégradation fongique de ces parois accélère encore plus la mise en place d'une résistance puisque les oligosaccharides obtenus servent d'éliciteurs endogènes.

##### Voie de l'acide jasmonique et production de phytoalexines (effet tardif)

Les phytoalexines sont des antibiotiques végétaux synthétisés au cours de la réaction d'hypersensibilité ou lors de la SAR. Leur synthèse peut être provoquée par des métabolites secondaires issus de la réponse précoce comme le  $H_2O_2$  ou le monoxyde



d'azote NO qui jouent les rôles de signaux (Kauffman *et al.*, 2001). Cependant, la voie royale de synthèse des phytoalexines est celle de l'acide jasmonique. L'acide jasmonique et son ester méthylique sont responsables de l'activation de la synthèse des enzymes qui produisent les phytoalexines (Kauffman *et al.*, 2001). Notons au passage que l'acide jasmonique, synthétisé à partir de l'acide linoléique, est un analogue structural des prostaglandines, qui sont des agents de signalisation paracrine et autocrine, qui activent de nombreux RCPG (récepteurs membranaires à 7 segments transmembranaires couplés à des protéines G) (Bonnemain *et al.*, 2003).

#### Voie de l'acide salicylique et production de protéines PR

Les protéines de défense les plus connues sont les protéines PR (*Pathogenesis Related*). Elles ont la propriété de résister à l'activité de protéases issues de la plante ou du pathogène. Elles peuvent attaquer l'agresseur, comme les chitinases capables de dégrader la paroi des pathogènes (Amborabé *et al.*, 2004). La voie de signalisation principale conduisant à leur synthèse est celle de l'acide salicylique. Cette molécule dérivée de la phénylalanine joue un rôle clé de messenger secondaire dans la mise en place des défenses de la plante (Dong *et al.*, 2014). Des études tendent à montrer que l'acide salicylique est le signal responsable de l'établissement de la SAR, mais cela reste à prouver.

Des chercheurs ont cependant observé son accumulation dans les plantes suite à une infection locale (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990), mais l'acide salicylique ne semble pas agir de façon systémique dans la plante (Gaffney *et al.*, 1993). Il participerait également à la réaction HR et au confinement de l'agresseur sur le site primaire (Kauffmann *et al.*, 2001).

#### Autres molécules signal

Les radicaux oxydants présents dans la réponse précoce peuvent activer l'expression de gènes de défense et provoquer ainsi la synthèse de protéines de défense (Kauffmann *et al.*, 2001). On peut citer le monoxyde d'azote, reconnu comme relais assurant et amplifiant des signaux d'origine végétale (Klarzinsky *et al.*, 2001). Les

formes oxydantes agissent aussi comme des molécules signal dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée (Kauffmann *et al.*, 2001). L'éthylène est également un médiateur chimique intéressant. Cette hormone végétale volatile est fortement produite en cas de réaction hypersensible. L'éthylène peut induire et stimuler les enzymes de la biosynthèse de phytoalexines, de lignification, mais aussi de la biosynthèse de protéines PR (Knoester *et al.*, 1998).

### Stratégie défensive efficace

Ce schéma illustre de manière simplifiée la séquence d'événements menant à la synthèse de molécules de défense chez les plantes dans le contexte de la résistance induite.

- 1 Reconnaissance entre l'agent pathogène et la plante.
- 2 Production par l'agent pathogène d'enzymes de dégradation des parois végétales.
- 3 Émission des éliciteurs, suite au début de la dégradation de la paroi (signal de stress).
- 4 Liaison des éliciteurs à des récepteurs membranaires et perturbation de la membrane.
- 5 Transmission du signal de stress au noyau par des messagers secondaires comme l'acide salicylique par exemple.
- 6 Activation des gènes de défense.
- 7 Synthèse de molécules de défense.
- 8 Une partie des molécules de défense vient renforcer ou réparer la paroi végétale pour bloquer la pénétration de l'agent pathogène.
- 9 Une autre partie des molécules de défense agit directement pour détruire l'agent pathogène.

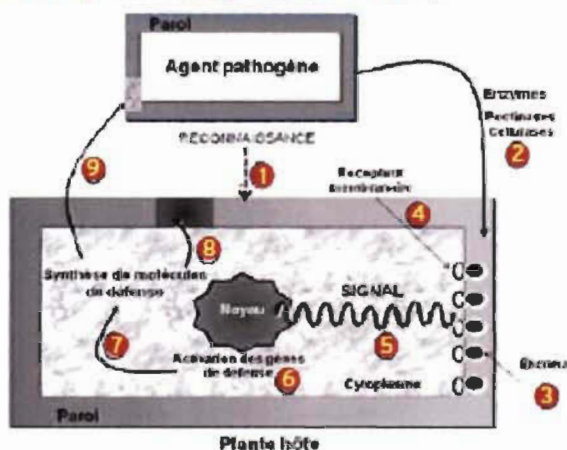


Figure 1.4 Les différentes étapes de la stratégie défensive de la plante.

Crédit photographique : Benhamou, Université de Laval, Québec.

### Vers les SDN : historique

En matière de recherche appliquée, c'est dans les années 1980, lorsque le principe global des substances élicitrices fut connu, que le biologiste américain Peter Albersheim et ses collaborateurs émirent l'idée d'utiliser les éliciteurs pour protéger les plantes et réduire l'utilisation de produits phytosanitaires. Le principe consiste à reproduire les interactions naturelles pour rendre les plantes capables de lutter elles-mêmes contre leurs agresseurs. Les scientifiques ont alors entrepris de détecter des molécules mimant les

agressions ou un état de stress pour induire les réactions de défense. Les éliciteurs, nommés aussi stimulateurs (ou substances) de défenses naturelles (SDN), sont des produits de haute technologie.

- **Molécules naturelles et de synthèse**

Nous trouvons d'abord des molécules d'origine biologique comme les polysaccharides (chitosane), les lipides, et en dernier lieu la laminarine (extraite d'algue). À côté, des produits organiques de synthèse ont été développés à partir des années 1980. Le probénazole, précurseur de la saccharine, fut le premier utilisé au champ et l'est encore contre la pyriculariose du riz au Japon qui est une maladie fongique causée par le champignon *Magnaporthe grisea* (Bari *et al.*, 2009). À la même époque fut développé le foséthyl-Al : cette molécule et son principal métabolite, l'acide phosphorique, sont surtout efficaces contre les oomycètes (Bari *et al.*, 2009). Il agit indirectement sur les défenses des plantes en provoquant chez le champignon une carence en phosphate qui stimule sa production de substances fongiques élicitrices : ce sont donc en fait de « faux SDN » (Leroux, 2005). Les dernières molécules de synthèse développées sont des analogues de l'acide salicylique, notamment l'acibenzolar-S-méthyl (benzothiadiazole ou BTH) (Leroux, 2003).

### ***1.2.3.2 Un exemple de SDN : le chitosane***

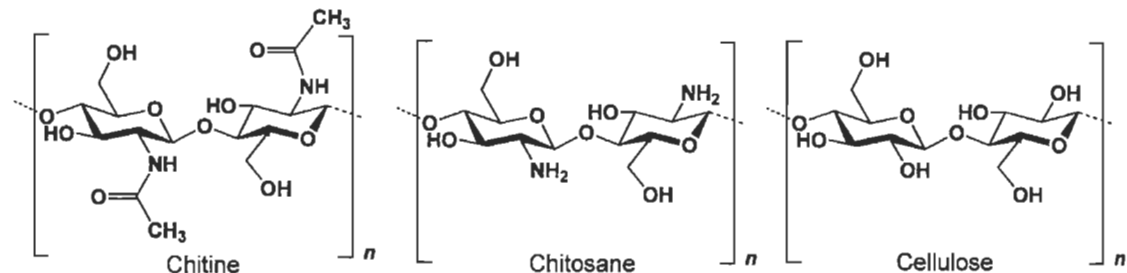
#### **Description du chitosane**

La chitine est un important polysaccharide de structure. Entre 30 et 50 % de l'enveloppe rigide extérieure des arthropodes (arachnides, crustacés, insectes) est composée de chitine. On retrouve également de la chitine dans la paroi de plusieurs champignons. Cependant, pour les fins commerciales, la chitine est extraite

principalement des carapaces de crustacés (Larousse, 1995). On compare la chitine chez les arthropodes à la cellulose des plantes. La chitine remplace alors la cellulose qui est utilisée par ces derniers à titre de matériel structurant de la paroi cellulaire. La chitine est constituée d'une chaîne linéaire de groupes acétylglucosamine. La chitine à l'état pur a une résistance qui s'apparente à celle du cuir, mais elle s'endurcit au fur et à mesure que le carbonate de calcium se fixe à elle. La chitine est un polysaccharide constitué presque entièrement d'unités de répétition D-glucosamine et N-acétyl D-glucosamine liées  $\beta$ -(1-4) (Figure 1.5). La nature hydrophobe de la chitine la rend insoluble dans l'eau aussi bien que dans la plupart des solvants organiques. Généralement le degré d'acétylation de la chitine est 90 % et plus. Ce polysaccharide est trouvé en très grande quantité dans l'environnement (Freepons, 1989).

Pour sa part, le chitosane est un polymère naturel d'origine marine et on le retrouve à l'état naturel dans plusieurs types de champignon. Il s'agit d'un co-polymère de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine à l'intérieur duquel entre 65 et 100 % des monomères sont des D-glucosamine (Figure 1.5). Faisant parti de la classe des amines, le chitosane est faiblement basique. Il a donc la propriété de former rapidement des sels avec certains acides tels les minéraux acides et les acides carboxyliques. Certains utiliseront donc des sels de chitosane dans leurs produits (Heinsohn et Bjornson, 1998). Il est facilement soluble dans la phase aqueuse à pH acide.

Le chitosane est obtenu de la chitine suite à une dépolymérisation et une déacétylation partielle. La déacétylation de la chitine se fait en milieu alcalin en présence de NaOH en forte concentration. La déacétylation permet de retirer de la chitine suffisamment de groupes acétyl ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ) pour permettre à la molécule d'être soluble dans la plupart des acides dilués. Cette opération libère des groupes amines ( $\text{NH}$ ) et confère au chitosane une nature « cationique » particulièrement intéressante en milieu acide. Les chitosanes sont caractérisés par deux facteurs principaux : leur viscosité et leur degré de déacétylation. Comme le démontre la Figure 1.5, la chitine et le chitosane ont une structure chimique semblable.



**Figure 1.5** Structure chimique de la chitine et du chitosane.

### Propriétés associées au chitosane

Le chitosane est reconnu principalement pour être un éliciteur de résistance chez les plantes (Hadwiger et Beckman, 1980; Leuba et Stossel, 1986; Benhamou et Lafontaine, 1995; Pelletier, 2000). Le chitosane et ses dérivés sont positivement chargés en milieu acide et par conséquent peuvent facilement adhérer aux sites portant des charges négatives. En raison du caractère cationique du chitosane et ses dérivées, ces molécules ont été utilisées dans plusieurs applications telles qu'en nutrition (Shahidi *et al.*, 1999; Shahidi et Synowiecki, 1991), en cosmétique (Majeti et Kumar, 2000; Felt *et al.*, 1998), en agriculture (Yamada *et al.*, 1993), en protection de l'environnement (Peniche-Covas *et al.*, 1987) en traitement des d'eaux usées (Jeon *et al.*, 2000; Kurita, 1998; Macchi, 1996; Jeuniaux, 1986), pour l'abaisser l'hypertension (Giustina et Ventura, 1995), le traitement et le soulagement de douleurs arthritiques (Lee *et al.*, 2003), le traitement des tumeurs (Nishimura *et al.*, 1986; Nishimura *et al.*, 1984) et pour leurs effets protecteurs contre les infections (Tokoro *et al.*, 1989).

### Action du chitosane sur la défense naturelle des plantes

L'utilisation du chitosane afin de contrer les maladies fongiques est sans aucun doute l'une des propriétés du chitosane la plus connue. En effet, les recherches sur cet aspect sont très avancées, notamment en agriculture. La chercheuse québécoise Nicole Benhamou (1996) démontrait qu'en plus d'inhiber directement la croissance du champignon responsable de la pourriture racinaire (*Fusarium oxysporum f.sp. radicis-*

*lycopersici*) des plantes de tomates, le chitosane sensibilise les plantes à réagir plus rapidement lors d'une attaque par le champignon (Benhamou, 1996).

Le chitosane aurait la propriété d'amorcer le phénomène connu sous le nom de résistance induite (Benhamou, 1996; Laflamme, 2000). Le chitosane présent dans les parois des champignons est libéré par ces microorganismes pathogènes. Mises en contact avec le chitosane, les plantes ont la capacité de synthétiser des protéines ayant un effet antimicrobien direct (chitinases et glucanases), ainsi que des composés structuraux limitant l'invasion des tissus par les microorganismes (Benhamou, 1996). Ce mécanisme de défense naturelle des végétaux est habituellement trop lent pour empêcher le pathogène d'infecter la plante. La présence du chitosane permet donc d'induire ce mécanisme de défense avant même que la plante ne soit en contact avec l'agent pathogène (Figure 1.6). D'autres études (Vance *et al.*, 1980; Boller, 1991; Graham, 1991; Popp *et al.*, 1997) ont démontré que la réaction de défense induite d'une plante qui est soumise en présence d'un pathogène implique principalement la lignification, la production d'éthylène, une augmentation de la production de chitinase et de glucanase (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2**

Les réponses de défenses induites par le chitosane *Arabidopsis thaliana*

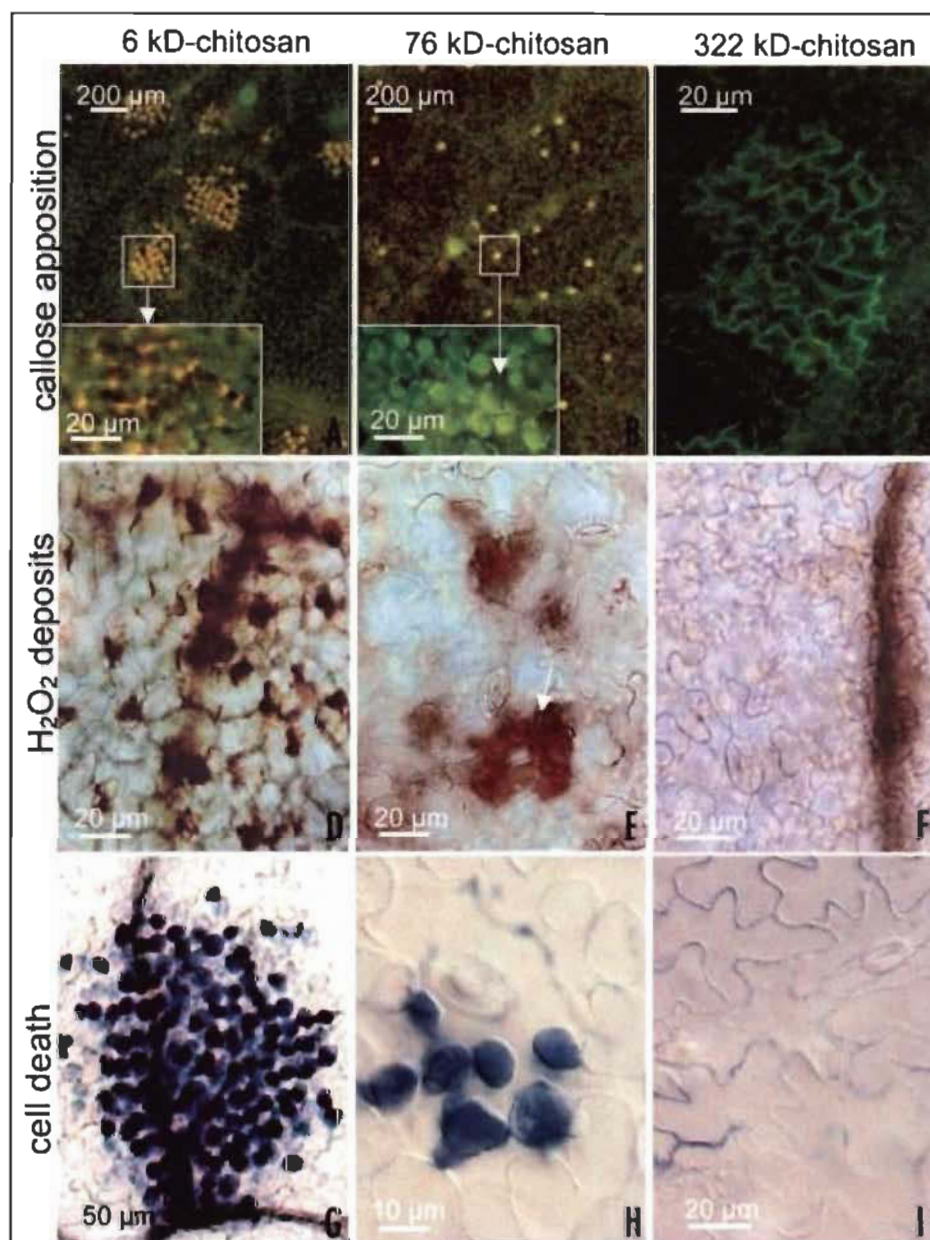
(Reproduit de Iriti *et al.*, 2009)

<b>La réponse de défense induit par le chitosane</b>	
<b>Réponse des plantes</b>	<b>Référence</b>
Calcium transient	Kauss <i>et al.</i> , 1985
Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase inhibition	Amborabé <i>et al.</i> , 2008
MAP kinase activation	Lizama <i>et al.</i> , 2007
Callose apposition	Faoro <i>et al.</i> , 2007
Reactive oxygen species	Lin <i>et al.</i> , 2005
Hypersensitive response	Iriti <i>et al.</i> , 2006

Program cell death	Wang <i>et al.</i> , 2008
Abcissic acid	Iriti <i>et al.</i> , 2008
Jasmonate	Doares <i>et al.</i> , 1995
Phytoalexin	Chakraborty <i>et al.</i> , 2008
Pathogenesis related proteins	Lin <i>et al.</i> , 2005
Systemic acquired resistance	Iriti <i>et al.</i> , 2006

Plusieurs autres chercheurs ont démontré l'effet antifongique du chitosane en agriculture. Hadwiger et son équipe (1988) expliquent que, lorsqu'appliqué sur des spores ou des mycéliums du champignon pathogène *Fusarium solani*, le chitosane inhibe la germination et la croissance mycélienne. De plus, les pois traités au chitosane étaient totalement immunisés contre *F.solani sp. Pisi* (Kendra *et al.*, 1984). Cette immunité s'explique par le fait que le chitosane active l'expression des gènes responsables de la résistance aux maladies, augmente la production des protéines intervenant dans la réponse de défense, augmente la production des enzymes qui permettent l'accumulation de pisatin ( antifongique et antibiotique), de callose et de lignine. Le chitosane induit également la sécrétion de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), composé sécrété suite à une blessure ou une attaque de pathogène (Orozco-Cardenas et Ryan, 1999) (Figure 1.6)





**Figure 1.6** Les différentes réponses de défense induites par le traitement au chitosane (Source : Iriti *et al.*, 2009).

Selon les groupes de Struszczyk et Li, le revêtement de chitosane appliqué sur les graines de plantes pourrait prévenir les maladies (Struszczyk *et al.*, 1989 et Li *et al.*, 1995). L'action protectrice du revêtement de chitosane à titre de traitement préventif s'expliquerait en partie par une augmentation de l'activité de protéines PR, lorsque la plante est au stade de semis. L'étude menée par Hirano (1988) ainsi que celle présentée



par Li *et al.* (1995) mentionnent que le revêtement de graines par du chitosane ou certains de ses dérivés augmente l'activité des chitinases au moment de la germination. L'étude de Li *et al.* (1995) utilisant des graines des plantes de tomates a permis de démontrer que non seulement l'activité des chitinases augmente suite à la présence de chitosane sous forme d'oligomères, mais également l'activité d'autres protéines telles les chitosanases, et les  $\beta$ -1,3 glucanases.

Les tests réalisés dans les cultures de cellules de pins démontrent qu'à de fortes concentrations, le chitosane pourrait induire une réaction hypersensible causant une forte proportion de mortalité chez les cellules (Lesney, 1990).

Au cours de l'étude réalisée sur différents champignons causant la carie des racines chez les conifères, Laflamme *et al.* (1999) appuie le concept voulant que la majorité des champignons, excepté ceux dont la membrane est constituée majoritairement de chitosane (zygomycètes), soient vulnérables au chitosane. Cependant, la croissance des champignons n'est pas toujours totalement interrompue par cette substance. Déjà en 1979, Allan et Hadwiger dressaient une liste des principaux champignons inhibés par le chitosane. Le tableau 1.3 présente les résultats qu'ils ont obtenu ainsi les concentrations auxquelles les champignons ont été inhibés.

Tableau 1.3

Les principaux pathogènes inhibés par le chitosane (Source : Allan et Hadwiger, 1979)

Geners and cell wall composition category	Minimum concentration (µg/ml) at which no growth was detected			
	Chitosan		Chitin	
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>
<b>Cellulose-B-glucan</b>				
<i>Phytophthora cactorum</i> (101a)	125	250	NE	NE
<i>P. cactorum</i> (101b)	125	125	NE	NE
<i>Phycomyces</i> (S42b)	125	125	NE	NE
<i>Pythium aristosporum</i>	1000	1000	NE	NE
<i>P. arrhenomanes</i>	1000	1000	NE	NE
<i>P. debaryanum</i>	250	250	NE	NE
<i>P. akanogense</i>	1000	1000	1000	1000
<i>P. ultimum</i>	1000	1000	NE	NE
<i>P. iwayamai</i>	1000	1000	NE	NE
<i>Aphanomyces euteiches</i> (P-24)	250	500	NE	NE
<i>A. euteiches</i> (N-2)	250	500	NE	NE
<b>Mannan-B-glucan</b>				
<i>Saccharomyces</i> sp.	250	500	1000	NE
<i>Ascochyta grovesii</i> (78-12)	1000	NE	NE	NE
<b>Chitin-B-glucan</b>				
<i>Neurospora</i> sp.	NE	NE	NE	NE
<i>Rhizoctonia</i> sp. (S179)	1000	1000	NE	NE
<i>Dutryella</i> sp. (78-3a)	1000	NE	NE	NE
<i>D. pulvinata</i> (78-14b)	500	500	NE	NE
<i>Eutypa</i> sp. (78-17b)	500	500	NE	NE
<i>E. flavovirens</i> (78-5)	NE	NE	NE	NE
<i>Cytosporina populina</i> (79-1d)	Ne	NE	NE	Ne
<i>Cytospora</i> sp. (S808)	Ne	NE	NE	NE
<i>Cytospora</i> sp. (S810)	500	500	NE	NE
<i>Gleospora</i> sp.	250	500	NE	NE
<i>Cephalosporium</i> sp. (S5117b)	125	250	NE	NE
<i>Botrytis</i> sp. (S44)	NE	NE	NE	NE
<i>Rosellinia limontispora</i> (S642ba)	1000	1000	NE	NE
<i>R. limoniispora</i> (S643ba)	1000	1000	NE	NE
<i>Eutypella aluifraga</i> (78-15)	NE	NE	NE	NE
<i>Cytosporina</i> sp. (T712)	75	250	NE	NE
<i>Cytosporina</i> sp. (S789bg)	500	500	1000	1000
<i>Cytosporina</i> sp. (S783bb)	500	1000	500	NE
<i>Cytosporina</i> sp. (S623bb)	NE	NE	NE	NE
<i>Cytosporina</i> sp. (S261eg)	75	75	1000	1000
<i>Cytosporina</i> sp. (S41ebca)	250	250	NE	NE
<i>Fusarium culmorum</i>	125	250	1000	NE
<i>F. avenaceum</i>	250	500	250	500
<i>Ferricillium dahliae</i>	500	1000	NE	NE
<i>Septoria</i> sp.	500	1000	NE	NE
<i>Helminthosporium sativum</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Epidermophyton floccosum</i>	250	250	NE	NE
<i>Basidiomycete</i> (S758)	250	500	250	500
<i>Basidiomycete</i> (S767ab)	500	500	500	500

## **Le chitosane : un PAMP bien connu**

Les plantes possèdent des mécanismes par lesquels ils reconnaissent les agents pathogènes. Ils possèdent des récepteurs transmembranaires (PRRs) qui sont capables d'interagir avec le PAMPs (Dangl *et al.*, 2001). Les PAMP sont libérés à partir de la paroi cellulaire de l'agent pathogène lors de l'attaque sur le site d'infection. Les polysaccharides de paroi cellulaire tels que les glucanes et le chitosane agissent comme PAMPs dans de nombreux pathosystèmes. Iriti et Faoro, 2009 ont rapporté que le chitosane se comporte comme un PAMP ou un éliciteur général, pouvant induire une résistance non hôte. Les réponses de défenses induites par l'application de chitosane comprennent l'augmentation de l'influx de  $H^+$  et  $Ca^{2+}$  dans le cytosol, l'activation de voie MAP-Kinase, la déposition de callose, la production d'espèce réactive d'oxygène (ROS), des réponses hypersensitives, de synthèse d'acide abscissique, et de jasmonates, de phytoalexines et des protéines PR (Amborabé *et al.*, 2008).

## **Mode d'action du chitosane**

Plusieurs hypothèses sont avancées quant au mode d'action du chitosane comme agent antifongique. Une hypothèse plausible (Leuba et Stossel, 1986; Kauss *et al.*, 1989; Laflamme *et al.*, 1999; Pelletier, 2000) explique que l'activité du chitosane serait corrélée avec une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique, probablement due à une interaction entre des phospholipides présentant une charge électrique situés dans la membrane cellulaire. Cette interrelation provoquerait certains déséquilibres osmotiques internes ce qui amènerait les cellules à se désorganiser. D'autres auteurs suggèrent que la formation de pores à l'intérieur de la membrane du champignon serait responsable de l'augmentation de la perméabilité et ainsi permettrait la fuite des protéines et des acides aminés hors de la cellule et ultérieurement, la plasmolyse de la cellule (El Ghaouth *et al.*, 1992). Le degré de vulnérabilité au chitosane exprimée par les différents champignons serait attribuable aux variations de la disponibilité et/ou du nombre de site de liaison (phospholipides) dans la membrane cellulaire des champignons (Laflamme *et al.*, 1999).

Une autre hypothèse explique que le chitosane entrerait dans la membrane du champignon et interagirait avec l'ADN présent, tout en altérant sa conformation, ce qui interromprait la synthèse des ARN messagers et la synthèse de protéines (Laflamme *et al.*, 1999; Pelletier, 2000).

### 1.3 Problématique

De nombreuses instances visent la production de cultivars plus résistants qui ne seraient plus sujets à la dévastation par les pathogènes. La première ligne de défense moléculaire de la plante est médiée par la reconnaissance de structures microbiennes appelées PAMP. Un PAMP bien connu est le chitosane. Le chitosane qui est un polymère provenant de la chitine est présentement utilisé dans plusieurs sphères d'activité, autant en médecine, en agriculture et au niveau industriel. Le chitosane est reconnu principalement pour induire des réponses pouvant aider les plantes à résister aux maladies. Des études démontrent également que le chitosane stimule la croissance des plantes, augmente la production des fruits, améliore les propriétés mécaniques de support des tiges et permettrait même aux plantes de résister au gel. À la suite d'une exposition au chitosane, les plantes monocotylédones et les dicotylédones déclenchent une réponse de défense spécifique au chitosane (Okada *et al.*, 2002). Le chitosane induit aussi une réponse immunitaire chez la souris (Reese *et al.*, 2007). Les études faisant intervenir le chitosane sont nombreuses dans le domaine de l'agriculture, notamment avec les céréales, les fruits et les légumes. Le chitosane sert à enrober les graines avant leur mise en terre afin de favoriser la germination et prévenir les semis contre les agents pathogènes. Il peut être appliqué comme amendement solide ou liquide afin de stimuler la croissance des plantes et la production de fruits, et par le fait même, augmenter la résistance des plantes contre les agents pathogènes. Sous forme foliaire, le chitosane aidait à la conservation et à la résistance contre les différents agents pathogènes.

Bien que le rôle du chitosane dans le processus physiologique et métabolique de la plante ait été bien décrit, la voie de signalisation de chitosane ainsi que les facteurs responsables de la reprogrammation transcriptionnelle due au chitosane sont encore

partiellement inconnus. Plusieurs criblages génétiques ont permis de trouver les protéines responsables de la signalisation en aval de la perception des PAMP (Zhang *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis thaliana*, la perception de la chitine se fait au niveau de la membrane plasmique par un récepteur kinase appelé CERK1 (Miya *et al.*, 2007). En effet, CERK1 se phosphoryle après l'exposition à la chitine et chitosane (chitine acétylée). Les récepteurs peuvent former des homodimères, une fois liés au chitine et activent son domaine kinase (Petutschnig *et al.*, 2010). Cependant, la voie de signalisation de chitine requiert la présence de co-récepteurs supplémentaires; 2 récepteurs kinases additionnelles, AtLYK4 et AtLYK5, qui sont impliqués dans la perception de chitine (Wan *et al.*, 2008b; Cao *et al.*, 2014). 2 voies de MAPK sont activées en aval de la signalisation de MAMP. La première conduit à l'activation de MPK3/MPK6 (Asai *et al.*, 2002). La seconde voie connue conduit à l'activation de MPK4 (Gao *et al.*, 2008). Récemment, MPK1, MPK11 et MPK13 sont également révélés être phosphorylées après le traitement au flg22 (Nitta *et al.*, 2014). La plante mutée *cerk1* perd la capacité à répondre à l'éliciteur chitine, y compris l'activation de MAPK, la production d'espèces réactives de l'oxygène et l'induction de l'expression génique (Miya *et al.*, 2007). Cependant, la voie de signalisation est toujours incomplète et les éléments transloqués au noyau pour activer la reprogrammation transcriptionnelle qui a lieu lors de la réponse de défense demeurent encore inconnus.

La méthode classique pour découvrir les éléments dans les voies de transduction de signal est le criblage génétique. Celui-ci vise à identifier un individu possédant des caractéristiques différentes de son parent, par exemple dans une descendance mutagenisée. Si une fonction est assurée par plus d'une protéine agissant en redondance, la fonction risque de ne pas être altérée par l'abolition de l'une des protéines, donc invisible dans un criblage génétique. Pour cette raison, bien que les criblages génétiques constituent un outil formidable, ils ne permettent pas toujours de mettre en lumière les protéines agissant en redondance. Or, la redondance des éléments offre de la robustesse aux mécanismes vitaux (Tsuda *et al.*, 2009), donc important. Par ailleurs, les éléments nécessaires pour la réorganisation de la transcription, vitale à la réponse de défense, doivent aller au noyau pour lier directement l'ADN ou agir sur des protéines qui lieront

l'ADN. Pour cette raison, nous utiliserons une autre approche, la spectrométrie de masse en tandem pour identifier les protéines de fractions.

#### **1.4 Objectifs**

En regard des résultats observés dans la littérature et de la problématique particulière à la production des cultivars plus résistants aux pathogènes sans nuire à l'environnement, nous avons déterminé quelles sont les protéines qui se relocalisent dans le noyau suite à un traitement avec du chitosane par une approche de spectrométrie de masse en tandem puisque les criblages génétiques n'ont pas permis de mettre en lumière les éléments agissant en redondance. L'objectif est l'amélioration de la résistance des végétaux grâce à l'identification de nouveaux acteurs de l'immunité.

Afin d'atteindre cet objectif, il faut optimiser les conditions de traitement avec le chitosane et le protocole d'extraction des protéines nucléaires compatible avec les conditions d'analyse de spectrométrie de masse (MS/MS), pour établir l'identité de protéines étant différentiellement présentes au niveau nucléaire suite à un stimulus associé à la réponse de défense (le chitosane).

## CHAPITRE II

### UNBIASED NUCLEAR PROTEOMIC APPROACH USING CHITOSAN TREATED *ARABIDOPSIS* PLANTS REVEALS NUCLEAR PROTEIN COMPONENT THAT PARTICIPATE IN MAMP-TRIGGERRED IMMUNITY

Article soumis au  
*Journal of Proteome Research*

#### 2.1 Contribution des auteurs

Zainab Fakih a réalisé les expériences, à l'exception des analyses de spectrométrie de masse, qui ont été faites au Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL) au Québec. L'article a été rédigé par Zainab Fakih et relu et commenté par Hugo Germain. Hugo Germain a financé le travail de recherche et la bourse d'études de Zainab Fakih.

#### 2.2 Résumé en français

Les plantes peuvent servir de source de nourriture abondante pour de nombreux micro-organismes potentiellement pathogènes et saprophytes. Cependant, un nombre relativement faible d'agents pathogènes parasitent les plantes et peu des organismes phytopathogènes peuvent surmonter l'immunité innée des plantes dans des conditions environnementales favorables et causer une maladie. MTI (MAMP- Triggered Immunity) est la première ligne de défenses moléculaires rencontrées par les agents pathogènes quand ils tentent d'infecter la plante. La voie de MTI est dépendante des récepteurs de reconnaissance qui se trouvent à la surface cellulaire et qui agissent en amont de voies de MAP –kinases. Le criblage génétique et l'utilisation des lignées mutantes ont largement contribué à notre connaissance des voies MTI. Cependant, le criblage génétique est confiné à des mutations phénotypiques, ce qui rend difficile l'identification des protéines agissant de manière redondante. La présente étude visait à

identifier de nouvelles composantes protéiques qui participent à MTI, en utilisant une approche indépendante de phénotype qui révélerait hg protéines localisées dans le noyau après l'induction de MTI. Nous analysons le protéome nucléaire des plantes Columbia - 0 et *cerk1* mutés, 15 minutes après l'induction de MTI par le chitosane. Notre approche a révélé que la plante mutée *cerk1* traitée par le MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern) montre beaucoup des protéines communes avec la plante Col-0 traitée. La plante *cerk1* montre également plusieurs protéines uniques qui sont absentes du Col-0 traité par le chitosane. Une analyse détaillée des protéines identifiées montre qu'il y a une accumulation nucléaire des enzymes de modification de l'ADN, des protéines de liaison à l'ARN et des protéines ribosomales. Aucune nouvelle MAPK n'a été identifiée, mais RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) une « scaffold » de kinase qui est une protéine impliquée dans la défense a été identifiée et une TIR-NB-LRR impliquée dans la résistance à *Leptosphaeria maculans* a aussi été retrouvé dans le noyau des plantes traitées.



### 2.3 Article scientifique

**Unbiased nuclear proteomic approach using chitosan treated *Arabidopsis* plants reveals nuclear protein component that participate in MAMP-triggerred immunity**

Zainab Fakh<sup>1,2</sup> and Hugo Germain<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, Université du Québec à Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7

<sup>2</sup> Groupe de Recherche en Biologie Végétale (GRBV)

\* For correspondence HG: hugo.germain@uqtr.ca

## Abstract

MAMP-triggered immunity (MTI) is the first layer of molecular defense encountered by pathogens when they attempt plant infection. MTI pathways are dependent on cell surface pattern recognition receptor which act upstream of MAP kinase pathways. Genetic screen and the use of mutant knock-out mutant lines have largely contributed to our knowledge of MTI pathways, however genetic screens are confined to phenotype-causing mutations, and sparsely enable discovery of redundantly acting proteins. We sought to discover protein components that participate in MTI using a phenotype independent approach that would reveal nuclear localized proteins following induction of MTI. We report on the nuclear proteome of Columbia-0 and *chitin elicitor receptor kinase 1* mutant plants 15 minutes after MTI induction. Our approach revealed that MAMP treated *cerk1* plant have a lot of common proteins with Col-0 treated plants. *cerk1* plants also shows several unique proteins, absent from Col-0 when elicited with chitosan. A detailed analysis of the proteins identified leads to a nuclear accumulation of DNA modification enzyme, RNA binding proteins and ribosomal proteins. No novel MAPK were identified although RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1 (RACK1), a scaffold protein involve in defense and a TIR-NB-LRR involved in resistance to *Leptosphaeria maculans* were found in the nucleus of chitosan treated plants and absent from water treated plants.

## Introduction

Plants have evolved a multilayered molecular surveillance system to detect potentially harmful pathogens. Beyond structural defenses, the first molecular layer is composed of transmembrane recognition receptors that detect slowly evolving microbial components (Boller and Felix, 2009). These microbes associated molecular patterns (MAMPs) include, among others, the bacterial flagellin (flg22) and elongation factor Tu (EF-Tu) (Kunze et al., 2004), recognized respectively by the leucine-rich repeat receptor kinases FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) and ELONGATION FACTOR RECEPTOR (EFR) (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Zipfel et al., 2006). Recognition of MAMPs by transmembrane pattern recognition receptors (PRRs) triggers ion fluxes, oxidative burst (Chinchilla et al., 2007) and MAPK pathway activation (Asai et al., 2002) leading to transcriptional reprogramming of over 1,200 genes (Zipfel et al., 2004) and the induction of the required basal defense response (Boller and Felix, 2009). Interestingly, the ensuing transcriptional change appears largely overlapping regardless of the initial MAMP perceived (Zipfel et al., 2006).

The importance of the MAMP-triggered immunity (MTI) is demonstrated by the arsenal of some pathogens which has evolved to suppress this defense layer (Espinosa and Alfano, 2004). Pathogens synthesize small molecules (termed effectors) that are either secreted in the apoplast or host-cell-translocated to promote pathogen virulence (Win et al., 2012) via the modification of the signal transduction pathway (Espinosa and Alfano, 2004). Inside the plant cell these effector may be recognized directly or indirectly by intracellular nucleotide-binding receptors of the leucine-rich family to trigger effector-triggered immunity (Chisholm et al., 2006; Caplan et al., 2008) which often culminates with the hypersensitive response (Jones and Dangl, 2006). Despite the important mechanistic differences between molecular recognition in MTI and PTI, both share some a largely overlapping transcriptional reprogramming (Navarro et al., 2004).

One of the PAMP receptor that has been widely investigated with some success is the chitin receptor. Chitin is a  $\beta$ -1,4-linked N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) polymer and has long been recognized as a potent MAMP in plant fungal interactions (Wan et al., 2008a). In *Arabidopsis*, chitin is perceived in part by CERK1 (CHITIN ELICITED RECEPTOR KINASE 1), *cerk1* knock-out plants loses the ability to respond to the

chitin elicitor, including MAPK activation, reactive oxygen species generation and induction of gene expression (Miya et al., 2007). Indeed, CERK1 does phosphorylate following exposure to chitin or chitosan (acetylated chitin) and the receptor can homodimerize when binding to chitin monomers to activate its kinase domain (Petutschnig et al., 2010). However, chitin signaling also requires additional co-receptors; two additional LysM receptor kinases, AtLYK4 and AtLYK5, are also involved in chitin perception (Wan et al., 2008b; Cao et al., 2014). Supporting the co-receptor theory is the fact that AtLYK5 does bind chitin with high affinity and can dimerize with CERK1 in a chitin-dependent manner (Cao et al., 2014).

Despite the importance of MTI, the intracellular perturbation that goes on following MAMP perception and before transcriptional reprogramming is still partly unknown. More precisely, the chitin-activated nuclear protein component that participate in the establishment of the basal defense response are partly unknown. Two MAPK pathways were shown to be activated downstream of MAMP signaling. One leads to the activation of the mitogen activated protein kinase MPK3 and MPK6 (Asai et al., 2002). The second known pathway leads to activation of the mitogen activated protein kinase MPK4 (Gao et al., 2008).

Recently, MPK1, MPK11 and MPK13 were also shown to be phosphorylated upon flg22 treatment (Nitta et al., 2014). The lack of defect in MTI for the knock-out lines corresponding to these three MAP kinases suggest functional redundancy (Nitta et al., 2014) and entails that many more components, acting downstream of the receptor activation may have been missed in phenotype-based screens.

In this study we sought to discover protein components that participate to MTI that have escaped phenotype-based screens. To this end, we used an unbiased approach based on protein mass spectrometry analysis of the nuclear proteome of young Arabidopsis plants subjected or not to chitosan treatment. Chitosan is known to also bind the CERK1 receptor (Petutschnig et al., 2010) and triggers a transcriptional response that overlaps with the response to chitin (Povero et al., 2011). Using high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry we identified several plant protein components that accumulate in the nucleus exclusively following chitosan treatment of Arabidopsis Columbia-0 plant or *cerk1* plants.

## **Results**

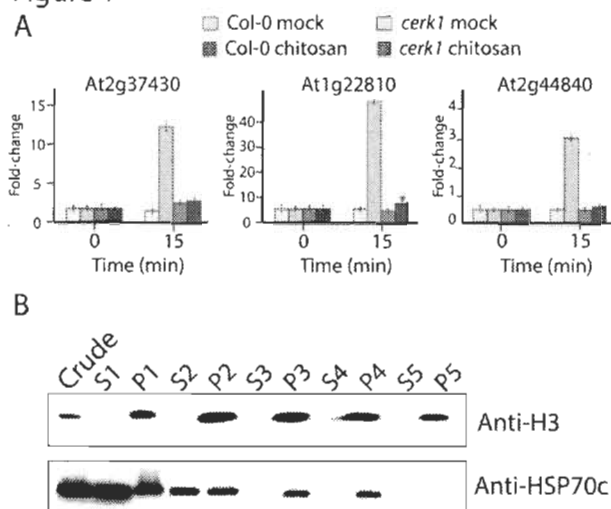
### **Chitosan treatment on Arabidopsis plants**

Before proceeding with the nuclear proteome mass spectrometry we sought to assess if the chitosan treatment was efficient in triggering a MAMP-like response. We used quantitative RT-PCR targeting At2g37430 (C2H2-ZF), At1g22810 (AP2/ERE) and At2g44840 (AP2/ERE), three genes that are amongst the most up-regulated following chitin treatment (Libault et al., 2007) showing respectively 78-fold, 91-fold and 37-fold induction 30 minutes after treatments. All three were strongly up-regulated following our chitosan treatment (Figure 1A).

### **Nucleus purification for mass spectrometry**

In order to discover components that were present in the nucleus, only the purified nuclear fractions were sent to the proteomic facility after assessing nuclear purity by Western blotting (Figure 1B). The cytosolic marker HSP70c could not be detected in the nuclear fraction of pellet 5 which was sent to the proteomic facility while the nuclear marker histone H3 was still clearly visible (Figure 1B).

Figure 1



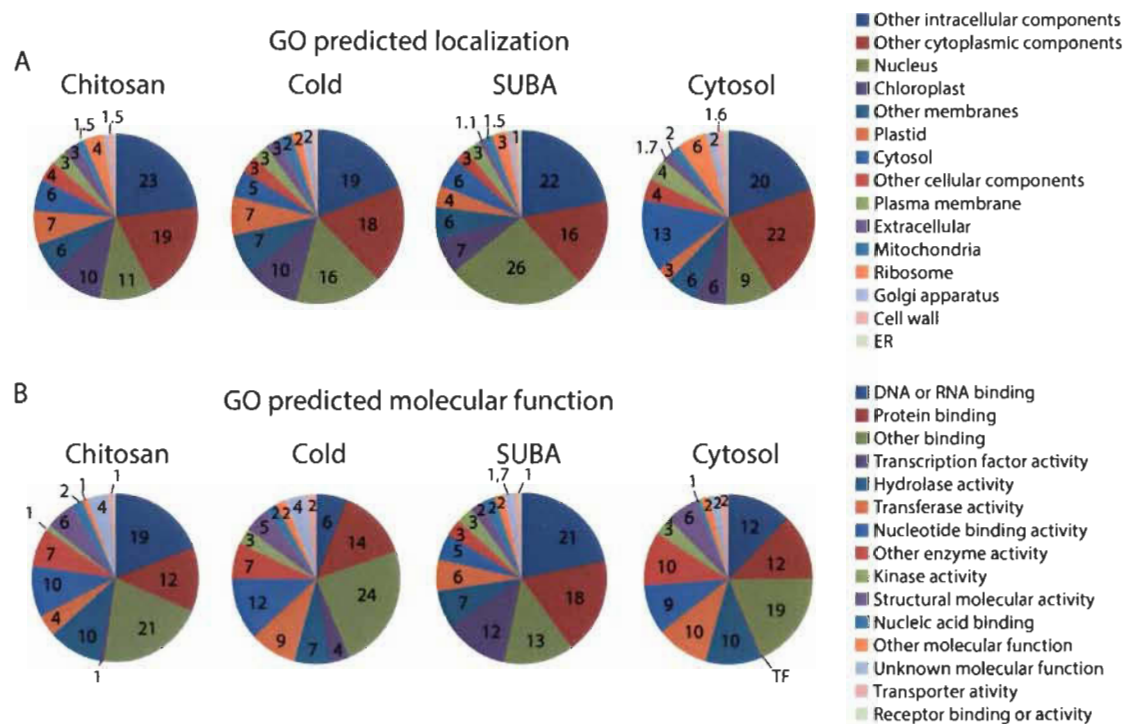
**Figure 1** A. Gene expression analysis using qRT-PCR of chitin responsive markers, the plants were collected 15 minutes following chitosan treatment. B. Western blot analysis showing the nuclei purification procedure. Anti-histone H3 was used as a nuclear marker and anti-HSP70c was used as a cytosolic marker. C for crude protein extract, S for supernatant and P for pellet.

### Nuclear proteomic results

Before searching components that could be involved in MTI, we compared the functional categorization of the 232 proteins that we found in the nucleus following chitosan treatment (in Col-0, *cerk1* and both combined) with the 182 proteins from the analysis of nuclear proteome of cold treated plants (Bae et al., 2003); one of the few study of the Arabidopsis nuclear proteome that our study can relate with. In parallel, we also performed a similar analysis with the Arabidopsis Subcellular Database (SUBA, <http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>) (Figure 2A) using only proteins that were predicted to be nuclear in SUBA. These proteins are either predicted to be nuclear by SUBA based on bioinformatics tools or confirmed to be nuclear (total of 4421 proteins). Finally, we compared our data to the data of the cytosolic proteome published by Ito et al. (2011). It should be noted that our proteome, Bae et al. (cold) and Ito et al. (cytosolic) proteome were obtained experimentally by LC-MS-MS while the SUBA dataset contains confirmed localization (GFP) but also predicted localization. The first

observation that can be drawn from the categorization based on sorting by predicted cellular component is that for the SUBA dataset, in which we chose only protein that were predicted as nuclear by SUBA, only 26% of the proteome were annotated as nuclear protein by TAIR's GO annotator (Figure 2A). This means that the remaining 74% may at some point be nuclear but the nucleus is not ascribed as its primary localization in GO. This reflects the fact that proteins may have several putative locations. The nuclear proteome of chitosan treated plants and cold-treated plants have 11% and 16% of proteins predicted as nuclear proteins while the cytosolic experimental proteome has 9% (Figure 3A). Based on the discrepancy observed in the SUBA dataset we can assumed that a good proportion of the proteins annotated as non-nuclear proteins by GO for the three experimental dataset are indeed nuclear proteins.

Perhaps more interesting in the context of finding protein components that participate to MTI is the categorization by molecular function (Figure 2B) which enables to identify proteins that have the capacity to modulate transcription or translation during the defense response. Our chitosan induced nuclear proteome contained 19% of DNA or RNA binding protein which can alter gene expression through DNA binding, mRNA processing and export or affect translation through mRNA nuclear segregation, fewer of those proteins were found in the cytosolic dataset (Ito et al., 2011). Proteins having transcription factor activity were most abundant in the SUBA dataset but represented 1%, 4% and 0.2% in the chitosan, cold and cytosolic proteomes respectively confirming that nuclear enrichment does indeed enrich for transcription factors. It should also be noted that empirically obtained proteomes are biased for abundant proteins which may mask or hide least abundant proteins (like transcription factors). Therefore, signaling components such as transcription factors may be underrepresented in LC-MS-MS proteome as demonstrated by their high abundance in the SUBA dataset (12%) relative to the three other datasets.



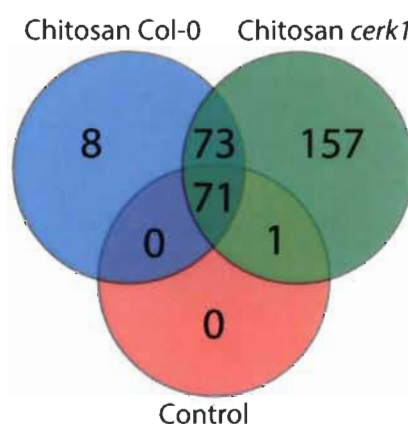
**Figure 2.** A. Gene ontology predicted subcellular localization using TAIR. B) A. Gene ontology predicted molecular function using TAIR.

### Identity of chitosan induced proteins

The tandem mass spectrometry results revealed that a total of 1372 different Arabidopsis proteins could be identified from a total 31,416 total spectra from our 8 samples (duplicates of *cerkl* or Col-0 treated or not with chitosan). To construct the Venn diagram and parse proteins, we set very conservative criteria for our analyses: all protein identified from a single spectra were rejected and all proteins that were present in only one of the duplicate were also rejected (same criteria had been applied for GO analysis). After applying these criteria 8 proteins specifically localizing to the nucleus in Col-0 following chitosan treatment were identified (Figure 3). Although at first sight most the proteins listed in Table 1 do not contains obvious MTI components, a clear trend can be observed. Proteins 1 (ribosomal protein S19E family), 4 (ribosomal protein I6), 5 (ribosomal protein S19E family), and 7 (RNase Z activity involved in tRNA processing) are all involved in translation. Protein 8 (DNA-binding transcriptional regulator) is



involved in transcription regulation while protein 6 (small nuclear ribonucleoprotein G) binds RNA and could be involved either in transcription or translation. The acid phosphatase listed as protein 2 is involved in deregulated AtTIL knock-out lines which are hypersensitive to oxidative stress (Charron et al., 2008). Almost all of these proteins have been reported to be modulated at the transcript level following biotic or abiotic stress but have not been linked with MAMP response previously.



**Figure 3.** Venn diagram depicting the number of proteins that accumulated in the nucleus in the different genotypes and treatments.

**Table 1.** Nuclear localized protein identified by LC-MS-MS in Col-0 following chitosan treatment.

	Identified Proteins	Uniprot ID	AGI
1	Ribosomal protein S19e family protein	D7KGE2	AT5G61170
2	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	Q9ZWC4	AT1G04040
3	Galactose mutarotase-like superfamily protein	Q8LFH1	At3g47800
4	Ribosomal protein L6 family protein	Q8L9N4	At1g18540
5	Ribosomal protein S19e family protein	D7MU11	AT5G61170
6	Probable small nuclear ribonucleoprotein G	O82221	At2g23930
7	Encodes a protein with RNase Z activity, role in tRNA processing	Q8L633	At2g04530

8	DNA-binding protein-related transcriptional regulator	O23063	At4g00390
---	---	--------	-----------

157 proteins appeared to localize in the nucleus following chitin treatment in *cerk1* plants. In theory, *cerk1* plants do not sense chitin and our qRT-PCR results indicates that the chitin responsive genes were not upregulated by chitosan in *cerk1* following treatment (Supplementary figure 1), it is however known that while chitin and chitosan response largely overlap, chitosan elicit the expression of 33% of gene not elicited by chitin (Povero et al., 2011). Table 2 shows the proteins grouped by molecular function most likely to affect MTI response (transcription factor and DNA/RNA binding protein)(all 157 proteins are shown in Supplementary Table 2). Several of these proteins may regulate gene expression or mRNA metabolism. Several additional proteins (not listed in table 2, shown in Supplementary Table 2) are RNA helicases which may affect transcription or translation. Interestingly one resistance protein of the TIR family was found (At4g16990), it is known as RLM3 and required for resistance to *Leptosphaeria maculans* and other necrophytic pathogens (Staal et al., 2008).

We also sorted the proteins that were found in both, the nucleus of Col-0 and *cerk1*, following chitosan treatment (at the intersection). These represent the core set of proteins localizing in the nucleus in presence or absence of CERK1 following chitosan treatment. A total of 67 proteins were identified (short list Table 3, full list Supplementary table 3). Most of the proteins found in common between Col-0 and *cerk1* following chitosan treatment are either DNA/RNA binding proteins or ribosomal proteins. Table 3 shows the list of proteins sorted by molecular function without the proteins associated with primary metabolism (for full list see Supplementary table 3). In the DNA/RNA binding proteins several proteins associated with chromatin remodeling and RNA maturation were found. Of the few proteins in Table 3 that are neither ribosomal or DNA/RNA binding protein was RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1 A (RACK1A). This protein has recently been shown to act as a scaffold protein in a new immune signaling pathway (Cheng et al., 2015). The proteins that were common between the two genotypes (Col-0 and *cerk1*) and the two treatments (water and chitosan), the ones at the intersection of the three circles (listed in Supplementary

Table 4) contained contaminating proteins from the chloroplast and mitochondria as well as many enzyme from the primary metabolism that likely contaminated the nuclear purification. True nuclear component such as nucleoporins, spliceosome assembly proteins and polymerase were found but very few RNA or DNA binding proteins and ribosomal components, strengthening the results obtained in the chitosan treated plants.

**Table 2.** Nuclear localized protein identified by LC-MS-MS in *cerk1* following chitosan treatment.

	Protein description	Uniprot ID	AGI
<i>Transcription factor or transcriptional regulator</i>			
17	MED16, Mediator of RNA polymerase	F4JGZ1	At4g04920
54	Small RNA degrading nuclease 3	F4K3N3	At5g67240
67	ACT domain subunit of acetolactate synthase protein	Q93YZ7	At2g31810
69	Trihelix transcription factor ASIL2	Q9LJG8	At3G14180
74	VERNALIZATION INDEPENDENCE 5, DNA binding	D7KW58	At1g61040
87	Sequence-specific DNA binding transcription factors	Q8LF33	At3G11100
110	Short life 1, PHD finger containing transcription factor	F4JV93	At4G39100
116	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 32	Q84VW5	At1G11760
118	Calmodulin-binding transcription activator 2, CAMTA2	Q6NPP4	At5G64220
121	EARLY BOLTING IN SHORT DAYS, chromatin assembly	O65462	At4g22140
<i>RNA-binding protein</i>			
23	Nucleosystemin-like 1, nucleolar GTP-binding protein	Q93Y17	At3g07050
28	RPT2a, regulates gene silencing via DNA methylation.	Q9SZD4	At4g29040
39	EMBRYO DEFECTIVE 2770, RNA-directed DNA methylation	Q9ZT71	At4g03430
40	Serine/arginine-rich SC35-like splicing factor	Q8L3X8	At3g55460
41	RZ1B, Putative RNA-binding involved in cold tolerance	O22703	At1g60650
43	WD-40 protein, histone deacetylation in abiotic stress	Q9FN19	At5g67320
47	TOUGH, Interacts with TATA-box binding protein 2. RNA	Q8GXN9	At5g23080

	binding		
51	THO complex subunit 7B, component THO/TREX complex	Q9M8T6	At3g02950
54	Small RNA degrading nuclease 3, regulation of transcription	F4K3N3	At5g67240
64	RNA binding (RRM/RBD/RNP motifs), RNA processing	F4J9U9	At3g12640
78	mRNA splicing factor, Cwf18	Q9MAB2	At3g05070
79	SWI/SNF complex subunit chromatin-remodeling complex	Q9XI07	At1g21700
80	Splicing factor U2af, necessary for the splicing of pre-mRNA.	Q8L716	At1g60900
96	Small nuclear ribonucleoprotein	Q9SUM2	At4g30220
120	Small nuclear ribonucleoprotein family protein, mRNA splicing	Q9C6K5	At1g76860
124	nuclear cap-binding protein, mRNA metabolism	Q9XFD1	At5G44200
157	RNA-binding protein-related	F4JM55	At4g28990

**Table 3.** Nuclear localized protein identified by LC-MS-MS in Col-0 and *cerk1* following chitosan treatment.

	Protein description	Uniprot ID	AGI
<i>Miscellaneous</i>			
6	Homologous to the co-chaperon DNAJ protein	Q94AW8	At3G44110
27	EPITHIOSPECIFIER MODIFIER 1, defense response to bacterium	Q9LJG3	At3G14210
35	RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1 A, MAP-kinase scaffold	O24456	At1G18080
<i>DNA-RNA binding proteins</i>			
4	Nuclear RNA binding protein A-like protein	Q8LDQ7	<a href="#">At5G47210</a>
5	GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7	C0Z2N6	At2g21660
15	mRNA splicing factor	B3H6J5	At3g49601
16	RNA BINDING PROTEIN	Q04836	At4G24770
20	RNA polymerase I-associated factor PAF67	F4JY76	At5g25754
21	ATWTF1, RNA recognition domain	A0MFS5	At4G01037
22	GENERAL REGULATORY FACTOR 3, 14-3-3 gene	P42644	At5G38480
23	COPPER RESPONSE DEFECT 1, putative ZIP protein, DNA binding	Q9M591	At3G56940
26	Histone deacetylase HDT2	Q56WH4	At5G22650
28	MAR-binding filament-like protein 1, DNA-binding protein	Q9LW85	At3G16000
32	Nucleosome assembly protein 1-like 1	B3H684	At4G26110
43	Emsy N Terminus and plant Tudor-like domain	Q9C7C4	<a href="#">At3G12140</a>

46	Histone deacetylase HD2A	F4J378	At3G44750
49	Serine/arginine-rich SC35-like splicing factor	Q9LHP2	At3G13570
59	U2 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN B, splicing	O22922	At2G30260
61	DEK domain-containing chromatin associated protein	Q84JB7	At5g63550
64	ATGRP8, glycine-rich protein with RNA binding domain	B9DFJ8	At4g39260
66	MLP-LIKE PROTEIN 423, defense response, mRNA modification	Q93VR4	At1G24020
<i>Translation</i>			
8	LOS1, translation elongation factor 2	Q9ASR1	At1g56070
17	Ribosomal protein L4/L1 family	F4KDU5	At5g02870
19	EMBRYO DEFECTIVE 2184, structural constituent of ribosome	Q9FWS4	At1G75350
24	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	Q9C5Z3	At3G57290
25	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	F4K4D5	At5G27640
29	40S ribosomal protein S3a-1	Q9CAV0	At3G04840
30	40S ribosomal protein S16-3	A8MRX2	At5g1838
31	Ribosomal protein L19	Q8W101	At1G02780
36	40S ribosomal protein S20-1	P49200	At3G45030
37	Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6	D7KNE3	At5g19510
38	Elongation factor 1-beta 2	Q9SCX3	At5g19510
39	Ribosomal protein S10p/S20e family protein	Q9LK61	At3G13120
40	Ribosomal protein L10 family protein	B5X0P0	At5g13510
47	50S ribosomal protein L19-2	Q8RXX5	At5g47190
48	TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT H1	Q9C5Z2	At1G10840
50	RIBOSOMAL PROTEIN S10E B	Q9FFS8	At5G41520
54	60S ribosomal protein L36-2	Q9M352	At3G53740
58	60S ribosomal protein L17-1	Q93VI3	At1G27400
60	40S ribosomal protein S24e	Q9SS17	At3G04920
62	Elongation factor 1B beta	A8MRC4	At1g30230

## Discussion

MTI response is dependent on the perception of conserved pathogen molecular pattern at the cell surface by pathogen recognition receptor (Boller and Felix, 2009). Following activation these receptor will activate downstream MAPK pathways (Jones and Dangl, 2006). Although two MAPK pathways are known to be involved in MTI signaling (Asai et al., 2002; Gao et al., 2008) recently more MAPK have emerged as being phosphorylated upon flagellin treatment (Nitta et al., 2014). Genetic screens have largely

contributed to our understanding of plant defense (Glazebrook et al., 1997) and the molecular dissection of defense signalling pathways (Monaghan et al., 2010). All genetic screens aim to find the genetic basis responsible for a phenotype, however when two or multiple proteins can perform the same cellular function and act redundantly, genetic screen are helpless since each of the single mutants often do not display a phenotype. Therefore we wanted to use an approach that would be phenotype independent to discover component that participate in the establishment of the defense reponse resulting from PAMP perception. To this end we used high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify component that localized to the nucleus following chitosan treatment.

We sprayed Col-0 and *cerk1* plants with chitosan and quickly froze the tissues 15 minutes after treatment. We took great care in preparing nuclear fraction according to Cheng et al. (2009) and we used HSP70c as a cytosolic marker to ensure that our nuclear fraction did not contain cytosolic proteins (Figure 1b). Despite all this care Figure 2A clearly shows that proteins from various cellular compartments were detected by mass spectrometry, however most of the contaminating proteins (chloroplastic, mitochondrial, primary metabolism) were found in all tissues and conditions and the intersection of the three circles (Supplementary table 4).

Many proteins related to translation were identified, for instance Table 3 contains nearly 50% of proteins that are either part of the ribosome or that actively take part in the translation. Since ribosomes are assembled in the nucleus it is not surprising to observe so many ribosomal proteins, however it is interesting to observed that their identity differs when the plants have been subjected to chitosan as these were not observed in the water treated control and specifically accumulate following chitosan treatment. It is well known that the ribosome composition is highly heterogenous and varies during the plant development to ensure translational regulation (Horiguchi et al., 2012). Hence, one could speculate that the ribosomes subunit may need to disassemble and reassemble following elicitor detection and triggering of MTI. Recently, JIP60 a barley protein that can mediate a switch in translation toward stress and defense protein synthesis was

discovered (Rustgi et al., 2014). This protein, which alters translation in the presence of jasmonate and at senescence, is composed of two domains including one having similarity to eukaryotic translation factor 4. Our lists contained several eukaryotic initiation and elongation factors that could have specific roles in regulation translation during biotic or abiotic stresses. To our knowledge the specific roles of ribosomal subunit has not been investigated thoroughly in the context of plant defense, but based on our results, it appears that some specific ribosomal subunit may participate in stress response.

One other types of protein that was observed abundantly in our study are DNA modifying enzymes that have the capacity to affect chromatin remodeling and further affect transcription. The role played by chromatin remodelling proteins in regulating Arabidopsis defence responses has been reviewed in Berr et al. (2012), it should be noted that mutation in chromatin-remodelling enzymes such as histone acetylase and deacetylase could result in pleiotropic phenotypes (Berr et al., 2012) not specifically associated with MTI or ETI but could play prominent roles in transcriptional repression and activation at the onset of these processes.

RNA-binding proteins of various families, including proteins linked to mRNA splicing, export and maturation represent a large number of the proteins that we identified following elicitation by chitosan. RNA export defect has previously been shown to suppress NB-LRR mediated immunity (Zhang and Li, 2005; Germain et al., 2010), basal response (Zhang and Li, 2005) and abiotic stress (Dong et al., 2006). Thus it appears that many more proteins in RNA metabolisms may participate in the defense response.

Boller and Felix (2009) reviewed in detail the molecular events that take place upon MAMP perception. As early as 30 seconds after perception  $H^+$  and  $Ca^{2+}$  influx concomitantly with  $K^+$  efflux occurs, while 2 minutes after perception oxidative burst also takes place. Experiments in leaf protoplast showed that MAPK activation can be detected within 5-10 minutes, which results in increased production of ethylene. Still with 10-20 minutes, receptor endocytosis starts to take place and the induction of nearly 1000 genes can be detected within 30 minutes. Additional changes will take place, those



will happen hours or in some cases days after MAMP perception (Boller and Felix, 2009).

Many molecular events take place during the first 15 minutes upon MAMP perception and they set a point of no return upon which the cell has committed to launch a massive transcriptional reprogramming required for the establishment of the basal response. We choose to focus on the early activated molecular components that participate to MAMP signaling in the nucleus. While the focus has largely been on MAP kinase pathways our data indicates that ribosome reorganization, DNA modification and RNA maturation could play major roles early during the response to MAMP. Specific components affecting translation or switching translation to a defense mode will be further investigated. Similarly, the participation of chromatin remodeling enzymes and RNA modifying enzyme should be investigated. The study of these components is however, hampered by the fact that the use of corresponding knock-out lines may display pleiotropic phenotype or show lethality and therefore alternative approaches will have to be used.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant materials and growth conditions**

*Arabidopsis thaliana cerk1* seeds (SALK\_007193) were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). Col-0 and *cerk1* seeds were sterilized for 2 min in 5% (v/v) bleach solution and 0.1% Tween-20 and were then rinsed in sterile water. The seeds were incubated at 4°C for 2 days and finally transferred to the growth room at 22°C in a 14h light/10h dark cycle. Plants were grown for 3 weeks in soil before the chitosan treatment was applied. *cerk1* genotyping was performed using PCR (for primers see Supplementary Table 1).

### **Chitosan preparation and treatment**

Low viscosity chitosan was purchased from Sigma-Aldrich and used at a concentration of 100 µg/ml. Chitosan treatment of *Arabidopsis* leaves was performed by spraying a chitosan solution until imminent run off and waiting 15 min before harvesting the



leaves. Chitosan was solubilised using glacial acetic acid, then diluted at 100µg/ml. Consequently, we used similarly diluted acetic acid solution to treat the control samples.

#### **Gene expression analysis for the verification of chitosan treatment.**

Total RNA was extracted using an RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and quantified by spectrophotometry. One microgram of each sample was reverse transcribed into cDNA with High capacity cDNA archive kit (Life Technologies) and diluted 10-folds. Quantitative RT-PCR amplification (qPCR) was carried out using an Mx3000P Detection system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), with primers described in Table S1. qPCR reactions were carried out using a SYBR Green PCR Master Mix (Bioline, London). 100 ng cDNA template, and primer sets (final concentration of 0.4 µM for each primer (Supplementary Table 1) were used in a final volume of 20µl). The thermal profile of the qRT-PCR reactions was: 95°C for 2 min, 40 cycles of 95°C for 5 s, 58°C for 10 s, and 72°C for 5 s. Moreover, to analyse the quality of the dissociation curves, the following program was added after the 40 PCR cycles: 95°C for 1 min, followed by a constant increase of the temperature from 55°C to 95°C. The data were analysed with the MxPRO QPCR software. An  $R_n$  threshold of 0.2 was selected to obtain the cycle threshold ( $C_t$ ) values. The expression of Actin 1(ACT1) gene was used to normalize all the qRT-PCR results due to its highly stable expression. Expression levels (Exp) of each gene were calculated according to the  $\Delta\Delta C_t$  equation. Three biological replicates for each treatment were analysed. Standard deviation was calculated in accordance with error propagation rule.

#### **Preparation of the nuclear proteins.**

To analyse the nuclear proteome content, nuclei were prepared using the method described by Cheng et al. (2009) with some modifications. Briefly, 15 minutes following treatment, 4g of 3 weeks-old *Arabidopsis* leaves were ground in liquid nitrogen. All the steps were performed on ice or at 4°C. Tissues were re-suspended in extraction buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.4), 25% Glycerol, 2mM EDTA, 2.5 mM  $MgCl_2$  and 1mM PMSF) and passed two times through nylon filter mesh of 60µm and 30 µm (Cedarlane,

Laboratory). The remainder of the protocol was carried out as previously described (Cheng et al., 2009). The nuclei enriched pellet was resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate and 1% sodium deoxycholate for trypsin digest, which along with mass spectrometry, was carried out at proteomic platform of the Centre de Recherche du CHU de Québec.

#### **Sample preparation for HPLC-ESI-QT Orbitrap Mass Spectrometry**

Protein in solution were alkylated and digested with trypsin. Tryptic-digested peptides were recovered through a series of extraction steps. Extraction with 25mM ammonium bicarbonate and acetonitrile was followed by a second extraction with 5% trifluoroacetic acid (TFA) and acetonitrile. Extracts were pooled and lyophilized in a vacuum lyophilizer. Lyophilized tryptic peptides were re-dissolved in a solution containing water, acetonitrile, and TFA (93:5:2), and bath-sonicated for 5 min. The peptide extract was prepared using the solution-phase nitrocellulose method (Landry et al., 2000).

#### **HPLC-ESI-QT Orbitrap-MS/MS and database searching**

Peptide masses were measured on a ESI-QT Orbitrap MS (Orbitrap Fusion, CHUL, QC, CA). Peptide mass fingerprint data were matched to the UniProt Arabidopsis database entries using the SCAFFOLD program (Scaffold\_4.4.0 Proteome Software Inc., Portland, OR). The following search parameters were applied. Mass tolerance was set to 10 p.p.m, and one incomplete cleavage was allowed. Alkylation of cysteine by carbamidomethyl, dehydrated of the n-terminus, glu-, pyro-Glu of the n-terminus, ammonia-loss of the n-terminus, deamidated of asparagine and glutamine and oxidation of methionine were set as possible modifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 6,0 % probability to achieve an FDR less than 1,0 % and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii et al., 2003). Two biological replicates were injected for all conditions. For comparison purposes three additional dataset were used; data was aggregated from the proteomic paper of cold-treated Arabidopsis plants of Bae et al. (2003) and from the Arabidopsis cytosolic proteome of Ito et al. (2011), finally we also extracted all the AGI's corresponding to the predicted nuclear proteins of Arabidopsis Subcellular Database (SUBA, <http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>).

**Immunoblotting**

The purity of the isolated nuclear fraction was evaluated by Western blot analysis. For immunoblotting, proteins were separated on 10%SDS polyacrylamide gels and electrotransferred onto PVDF membranes. Membranes were incubated with anti-Histone H3 (Agrisera) and anti-Hsp70c (Agrisera) antibodies for one hour. Antibody-bound proteins were detected by incubation with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase using the ECL system. All washes were performed as previously described (Germain et al., 2007).

# SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Table S1.** Primer list used in this study.

cerk1 genotyping	SALK_007193C_LP	GACGCCACAGAGTTAAAGCAG
	SALK_007193C_RP	TGAAGCTTCCTTAGATTCCCC
qRT-PCR	AT1G22810-F	TCCACAGTACCAGCGTGAAC
	AT1G22810-R	GGCCGCCCAGATAATCATAC
	AT2G37430-F	GTTTTGAAACGATGCGGTAG
	AT2G37430-R	GGGACAAATGTCTTCCCAAAG
	AT2G44840-F	CAGTTAACGTCGGAGCAGAAG
	AT2G44840-R	CATCGAAGTAAAACCTGATCCAC
	Actine 1-F	CGATGAAGCTCAATCCAAACGA
	Actine 1-R	CAGAGTCGAGCACAATACCG

**Table S2.** List of all the proteins identified in the nucleus of chitosan treated *cerk1* plants.

	Protein description	Uniprot ID	AGI
1	Ribosomal protein L6 family	Q9FZ76	At1G18540
2	Hyaluronan / mRNA binding family	O23593	At4g17520
3	Putative uncharacterized, mRNA binding family	Q9LN10	At5g11240
4	Transducin family protein/WD-40 repeat family protein, nucleotide binding,	B5X503	At5g11240
5	Carboxyltransferase alpha subunit of acetyl-CoA carboxylase	Q9LD43	At2G38040
6	RPT1A, 26S protease regulatory subunit 7 homolog A, REGULATORY PARTICLE TRIPLE-A 1	Q9SSB5	At1g53750
7	CRWN3, Crowded nuclei 3, nuclear matrix component	Q9CA42	At1G68790
8	FUG1, Translation initiation factor	Q9SHI1	At1g17220
9	AMY3, Alpha-amylase 3	Q94A41	At1G69830
10	MGP1 MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1, FAD subunit of mitochondrial F1F0-ATP synthase	F4III4	At2g21870
11	Chromatin structure-remodeling complex protein SYD	F4IHS2	At2g28290
12	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	Q540F4	At5G04140
13	Protein EMSY-LIKE 3, regulation of chromatin states, basal immunity (PubMed:21830950)	F4K2F0	At5G13020
14	CDC73 homolog, Component of the PAF1 complex (PAF1C) which is involved in histone modifications	Q9LJ87	At3g22590
15	Shepherd, HSP90-like protein	D7M8W9	At4G24190
16	Subunit of eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) required for binding of mRNA to 40S subunit	Q0W/W10	At4g11420
17	MED16, Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16, positive regulation of SAR	F4JGZ1	At4g04920
18	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 2 GAMMA SUBUNIT	O64490	At1g04170
19	ATP5CS, DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1	B9DFG0	At2G39800
20	Putative ribosomal protein S9	Q67Y29	At1g74970
21	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PS13A	At5g15620
22	ACT domain-containing protein	Q9FZ47	At1g16880
23	NUCLEOSTEMIN-LIKE 1, nucleolar GTP- binding protein involved in RNA methylation	Q93Y17	At3g07050
24	26S protease regulatory subunit 8 homolog B	D7LZD8	At5g20000
25	14-3-3-like protein GF14 omega	Q01525	At1g78300
26	NAD(P)H DEHYDROGENASE SUBUNIT 48	Q9S9N6	At1g15980
27	MAK16 protein-related, RNA methylation	F4I4Q1	At1g23280
28	RPT2a encodes the 26S proteasome subunit, shown to regulate gene silencing via DNA methylation.	Q9SZD4	At4g29040
29	TGF-BETA RECEPTOR INTERACTING PROTEIN 1, co-immunoprecipitates with BRI1	Q0W/VZ3	At2g46280
30	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	O50008	At5G17920
31	TRANSCURVATA 1, encodes a member of the Nup62 subcomplex of the Arabidopsis NPC.	Q8RWH9	At4g37130
32	MITOTIC ARREST DEFICIENT 1, encodes a spindle assembly checkpoint protein MAD1	Q9LTY1	At5g49880
33	Protein TOC75, mediates the insertion of proteins targeted to the outer membrane of chloroplast	Q9STE8	At3g46740
34	RNA-binding motif/Ribosomal protein S4 family protein	Q683D4	At5g15750
35	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	Q8LCC7	At4g22380
36	PRP38 family protein, Pre-mRNA-splicing factor 38	Q8LB54	At2g40650
37	Carboxylate clamp-tetratricopeptide repeat protein, interact with Hsp90/Hsp70 as co-chaperones.	O48802	At1g6239
38	RNA helicase DRH1	Q8H136	At3G01540
39	EMBRYO DEFECTIVE 2770, RNA-directed DNA methylation, mRNA splicing	Q9ZT71	At4g03430
40	Serine/arginine-rich SC35-like splicing factor	Q8L3X8	At3g55460
41	RZ1B, Putative RNA-binding, zinc finger- glycine-rich RNA-binding involved in cold tolerance	O22703	At1g60650
42	EMBRYO DEFECTIVE 2738, GTP binding	B5X565	At3g12080
43	WD-40 protein involved in histone deacetylation in response to abiotic stress	Q9FN19	At5g67320
44	LFR, Armadillo-repeat containing protein	Q9LS90	At3g22990
45	VATE1_V-type proton ATPase subunit E1	D7LYX4	At4g11150
46	SWIB/MDM2 domain superfamily protein, function unknown	O82326	At2g14880
47	TOUGH, Interacts with TATA-box binding protein 2, RNA binding	Q8GXN9	At5g23080
48	40S ribosomal protein S11-1	P16181	At3g48930
49	RH40_DEAD box RNA helicase family protein	Q9SQV1	At3G06480
50	2-oxoglutarate dehydrogenase	F4IIV2	At3g55410
51	THO complex subunit 7B, component THO/TREX complex, RNA splicing,	Q9M8T6	At3g02950
52	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein;	Q9FZ82	At1G18610
53	26-kD peroxisomal membrane protein, Belongs to the small heat shock protein (HSP20) family	A7VJH1	At1G06460
54	Small RNA degrading nuclease 3, regulation of transcription	F4K3N3	At5g67240
55	Ribosomal S17 family protein	B9DGM0	At5G04800
56	26S protease regulatory subunit 6B homolog	Q9SEI4	At5g58290
57	Signal recognition particle 54 kDa protein	P37107	At5g03940
58	Phototropin 2	A8MS49	At5g38140
59	Alpha-adaptin (alpha-ADR), protein transporter activity	Q8LPL6	At5g22770
60	Oxidoreductases,	C0Z2J2	At2g19940



61	Probable sucrose-phosphatase 2	Q9SJ66	At2g35840
62	RPT5B, 26S protease regulatory subunit 6A homolog B	Q04019	At1g09100
63	TIR-NB-LRR receptor-like protein that confers resistance to the pathogens <i>L. maculans</i>	Q9FT77	At4g16990
64	RNA binding (RRM/RBD/RNP motifs), RNA processing	F4J9U9	At3g12640
65	LWD1, transcription regulatory region DNA binding	Q9LPV9	At1g12910
66	Magnesium-chelatase subunit	P16127	At4g18480
67	ACT domain-containing small subunit of acetolactate synthase protein	Q93YZ7	At2g31810
68	RPN10, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	P55034	At4g38630
69	Trihelix transcription factor ASIL2, sequence-specific DNA binding transcription factors	Q9LJG8	At3G14180
70	Elongation factor G	Q9SI75	At1g62750
71	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein, nucleotide binding	Q94AH2	At5g64730
72	ARATH ABC transporter F family 4	Q9M1H3	At3g54540
73	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b	A8MS75	At3g54890
74	VERNALIZATION INDEPENDENCE 5, regulation of transcription. DNA binding	D7KW38	At1g61040
75	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein	B9DFQ2	At4G16630
76	Surfeit locus protein 6, function unknown	A8MR82	At5g05210
77	Thiamine thiazole synthase	Q38814	At5g54770
78	mRNA splicing factor, Cwfl8	Q9MAB2	At3g05070
79	SWI/SNF complex subunit SWI3C, ATP-dependent chromatin-remodeling complex	Q9XI07	At1g21700
80	Splicing factor U2af large subunit B. Necessary for the splicing of pre-mRNA.	Q8L716	At1g60900
81	RNA polymerase subunit	Q39215	At1G60850
82	DNA J PROTEIN A7, Molecular chaperone	B9DFS2	At1G80030
83	vacuolar ATP synthase subunit H family protein	B9DHN8	At3G42050
84	Unknown protein	F4IYD5	At3g01060
85	GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase	Q9M153	At4g01130
86	PER31 Peroxidase 31	Q9LHA7	At3g28200
87	Sequence-specific DNA binding transcription factors	Q8LF33	At3G11100
88	26S protease regulatory subunit 10B homolog A	Q9SEI3	At5G43010
89	DNA J PROTEIN A5, molecular chaperone	Q940V1	At4g39960
90	Zinc knuckle (CCHC-type), RNA/DNA binding	Q9LZQ7	At3g62330
91	Casein kinase-like protein	Q9LID3	At3g13670
123	ATP-dependent helicase activity	P93008	At2G33730
124	nuclear cap-binding protein, mRNA metabolism	Q9XFD1	At5G44200
125	Signal recognition particle 19 kDa protein	Q943Z6	At1G48160
126	predicted to encode a protein with a DWD motif, nucleotide binding	Q5XEV4	At1g65030
127	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 51, RNA methylation	Q9LIH9	At3G18600
128	TUDOR-SN protein. RNA binding protein with nuclease activity essential for stress response.	F4K6N0	At5G07350
129	Tripeptidyl Peptidase II	F4JVN6	At4G20850
130	40S ribosomal protein S23	Q8LG36	At3G09680
131	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase PRH75	Q39189	At5G62190
132	Elongation factor Ts, RNA binding, translation elongation factor activity	Q9SZD6	At4G29060
133	Histone chaperone. Binds to 18S rDNA and represses its expression.	F4JSK5	At4G25340
134	Ribosomal protein S5 family protein	B5BRD8	At1g58684
135	PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1, positive regulation of transcription	C0Z238	At1g42550
136	60S ribosomal protein L24-, RNA methylation	P38666	At3G53020
137	3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE	Q00218	At4G33510
138	Glutathione S-transferase F10	P42761	At2G30870
139	Rubredoxin-like superfamily protein	Q9FI47	At5G51010
140	Glycine-rich protein, RNA/DNA binding. DSB-repair	F4JP90	At4g17620
141	MALATE DEHYDROGENASE	B9DI56	At3G47520
142	Signal recognition particle, RNA binding	B9DGY4	At2G43640
143	HEAT STRESS TOLERANT DWD 1	Q9ZUN8	At2G19540
144	Unknown function	C0Z386	At3g60810
145	Small-subunit processome, Utp12	Q8L403	At1g15420
146	FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3	Q9LIE5	At3G22170
147	Ribosomal protein L7Ae	Q9SKZ3	At2G32060
148	ketol-acid reductoisomerase	Q05758	At3G58610
149	Pescadillo nucleolar protein, regulates of ribosome biogenesis and mitotic progression.	Q9LYK7	At5G14520
150	Putative uncharacterized protein	F4JRA0	At4G37090
151	HEMERA, Present in transcriptionally active plastid chromosomes.	O64683	At2G34640
152	SEC6, member of the exocyst complex gene family	Q94AI6	At1G71820
153	LIPOAMIDE DEHYDROGENASE 1	Q9MSK3	At1G48030

92	ARM repeat superfamily protein, metal binding	Q94K48	At3g62530
93	Nucleus-acting plant-specific clock regulator	B3H7F6	At3G22380
94	Protochlorophyllide reductase C	D7KCG7	At1G03630
95	Glutathione S-transferase	D7KBE1	At1G02930
96	Small nuclear ribonucleoprotein	Q9SUN2	At4g30220
97	Thioredoxin-like protein CITRX	Q9M7X9	At3G06730
98	60S ribosomal protein L14-1	Q9S1M4	At2g20430
99	COBRA, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein	Q94KT8	At5G60920
100	Probable methyltransferase PMT14	Q94EJ6	At4g18030
101	40S ribosomal protein	O64630	At2G45710
102	Dihydroipoamide acetyltransferase	Q8RWN9	At3g13930
103	40S ribosomal protein S3a	Q42262	At4G34670
104	PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR 1, PME1	Q8LC60	At4G12390
105	Prohibitin-2	Q9ZNT7	Q9ZNT7
106	Glutathione transferase	O80852	At2G30860
107	ROOT INITIATION DEFECTIVE 3, nucleotide binding	Q9M3B4	At3G49180
108	ACYL-COA OXIDASE 5	Q9ZQP2	At2G35690
109	MITOCHONDRIAL PHOSPHATE TRANSPORTER 3	Q9FMU6	At5G14040
110	Short life 1, PHD finger and BAH motif containing putative transcription factor	F4JV93	At4G39100
111	Sterile alpha motif (SAM) domain-containing protein, chromatin silencing by small RNA	F4ISC6	At1G70180
112	40S ribosomal protein S19	Q9FNP8	At5G61170
113	ENHANCED SILENCING PHENOTYPE 4, RNA processing	Q9M033	At5G01400
114	Suppressor-of-White-Apricot, RNA processing	O49570	At4g31200
115	3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE 1, KAS1	P52410	At5G46290
116	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 32	Q84VW5	At1G11760
117	CELL DIVISION CYCLE 48, cell division cycle protein, a member of AAA-type ATPases gene family	B9DI55	At3g09840
118	CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR 2, CAMTA2	Q6NPP4	At5G64220
119	Signal recognition particle 9 kDa protein	Q9SMU7	At3G49100
120	Small nuclear ribonucleoprotein family protein, mRNA splicing	Q9C6K5	At1g76860
121	EARLY BOLTING IN SHORT DAYS, chromatin assembly or disassembly, regulation of transcription,	O65462	At4g22140
122	protein homologous to translationally controlled tumor protein (TCTP) from Drosophila	P31265	At3G16640
154	ATU2AF35A, RNA splicing, mRNA processing	A8MRI1	At1G27650
155	Importin subunit alpha	F4HZG6	At1G09270
156	ZINC FINGER PROTEIN 1, negative regulation of translation	Q8GXX7	At3G02830
157	RNA-binding protein-related	F4JM55	At4g28990

Table S3. List of all the proteins identified in the nucleus of chitosan treated *cerk1* plants.

	Protein description	Uniprot ID	AGI	Number of spectrums			
				CERK1 chitosan		Col-0 chitosan	
				Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2
1	Magnesium-chelatase subunit ChlD	Q85JE1	At1G08520	23	14	9	10
2	FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 2	Q944G8	At4G38970	12	9	10	9
3	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase small subunit	Q0WVH4	At1g67060	8	3	8	2
4	Nuclear RNA binding protein A-like protein	Q8LDQ7	At5G47210	9	6	8	8
5	GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7, DNA binding, RNA binding	C0Z2N6	At2g21660	7	8	5	5
6	Homologous to the co-chaperon DNAJ protein	Q94AW8	At3G44110	7	6	8	5
7	SAR DNA-binding protein, DNA binding	O04658	At5G27120	11	9	7	8
8	LOG1, translation elongation factor 1	Q9ASR1	At1g56070	15	10	5	4
9	60S ribosomal protein L18a	P51418	At2G34480	7	8	4	4
10	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	P56764	AtCG00170	5	13	6	9
11	ACTIN 8	Q8LB94	At1G49240	9	3	4	6
12	HYDROXYPYRUVATE REDUCTASE	Q9C9W5	At1G68010	13	9	6	4
13	ALANINE-3-OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE 1	Q9LR30	At1G23310	11	12	5	5
14	VESICLE-INDUCING PROTEIN IN PLASTIDS 1, VIPP1	O80796	At1G65260	8	8	4	4
15	mRNA splicing factor	B3H6J5	At3g49601	11	8	5	3
16	RNA BINDING PROTEIN, RNA modification, RNA processing, RNA stabilization	Q04836	At4G24770	5	5	5	4
17	Ribosomal protein L4-L1 family	F4KDU5	At5g02870	4	4	3	15
18	SKS4, oxidoreductase activity	O65449	At4g23010	8	5	5	6
19	EMBRYO DEFECTIVE 2184, structural component of ribosome	Q9FW54	At1G75350	5	5	4	2
20	RNA polymerase I-associated factor PAF67	F4FY76	At5g25754	9	7	5	5
21	ATWTF1, RNA recognition domain	A0MFP5	At4G01037	9	10	4	5
22	GENERAL REGULATORY FACTOR 3, 14-3-3 gene	P42644	At5G38480	4	8	5	7
23	COPPER RESPONSE DEFECT 1, putative ZIP protein, DNA binding	Q9M591	At5G56940	8	7	5	3
24	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	Q9CSZ3	At3G57290	8	8	5	3
25	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	F4K4D5	At5G27640	11	5	4	4
26	Histone deacetylase HDT2	Q56WH4	At5G22650	5	5	3	4
27	EPITHIOSPECIFIER MODIFIER 1, defense response to bacterium, glucosinolate biosynthetic process	Q9LJG3	At5G14210	7	6	4	3
28	MAR-binding filament-like protein 1, DNA-binding protein	Q9LW85	At3G16000	8	6	4	6
29	40S ribosomal protein S3a-1	Q9CAV0	At5G04840	6	7	4	2
30	40S ribosomal protein S16-3 OS=Arabidopsis thaliana G2=At5g18380 PE=4 SV=1	A8MRX2	At5g1838	4	4	4	3
31	Ribosomal protein L19	Q8W101	At1G02780	4	4	3	5
32	Nucleosome assembly protein 1-like 1	B3H684	At4G26110	4	6	4	3
33	Rho-N domain-containing protein 1	Q94K75	At1G06190	5	6	4	4
34	Geranylgeranyl reductase	Q9CA67	At1G74470	7	6	3	5
35	RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1 A, MAP-kinase scaffold activator	O24456	At1G18080	6	5	5	3
36	40S ribosomal protein S20-1	P49206	At3G45030	5	4	4	3
37	Translation elongation factor EF1B-ribosomal protein S6	D7KNE3	At5g19510	6	6	4	2
38	Elongation factor 1-beta 2	Q95CX3	At5g19510	5	6	5	3
39	Ribosomal protein S10p-S20e family protein	Q9LX61	At3G13120	3	3	3	3
40	Ribosomal protein L10 family protein	B5X090	At5g13520	3	4	5	3
41	Putative H <sup>+</sup> -transporting ATP synthase	Q8RY87	At4G09650	6	5	5	2
42	METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 4	Q9LUT2	At3G17390	7	3	2	3
43	Emmy N Terminus and plant Tudor-like domain, defense response to fungus	Q9C7C4	At3G12140	4	4	5	4
44	Function unknown	Q9FKA3	At5g10570	3	3	2	3
45	Proteasome component (PCI) domain protein	Q8W4A0	At3G02290	6	6	5	2
46	Histone deacetylase HD2A	F4J378	At3G44750	2	2	5	2
47	50S ribosomal protein L19-2	Q8RYX5	At5g47190	2	6	3	3
48	TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT H1	Q9C3Z2	At1G10640	6	4	4	3
49	Serine/arginine-rich SC35-like splicing factor	Q9LHP2	At3G13570	4	4	5	2
50	RIBOSOMAL PROTEIN S16S B	Q9FF58	At5G41520	5	5	4	2
51	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	P46283	At3g55800	5	4	4	4
52	Function unknown	Q9LU74	At5g57120	2	4	4	3
53	Function unknown	Q9LFX8	At1g27090	6	3	2	4
54	60S ribosomal protein L16-2	Q9M352	At3G53740	4	2	2	4
55	CHLOROPLAST RNA-BINDING PROTEIN 19	Q43349	At3G53460	3	2	2	2
56	Encodes one of two isoforms for the 26S proteasome regulatory protein (R20) subunit RPN5	B3H6B0	At5G09990	3	6	4	2
57	BETA GALACTOSIDASE 1	Q9SCW1	At3G13750	3	2	6	2
58	60S ribosomal protein L17-1	Q93V13	At1G27400	5	3	3	3
59	U1 SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN B, splicing	O22923	At2G30260	3	3	3	2
60	40S ribosomal protein S24e	Q9SS17	At3G04920	4	4	2	2
61	DEX domain-containing chromatin associated protein	Q84JB7	At5g63540	4	3	3	2
62	Elongation factor 1B beta	A8MPC4	At1g30230	3	2	3	2
63	PSE27, photosystem II repair	Q8LR64	At1G03600	4	2	2	2
64	ATGEP8, glycine-rich protein with RNA binding domain at the N-terminus	B9DFJ8	At4g39280	3	2	3	2
65	Triacylglycerol lipase-like 1	F4HRB4	At1G45201	4	3	2	2
66	MLP-LIKE PROTEIN 423, defense response, mRNA modification	Q93VR4	At1G24930	2	2	2	2
67	Function unknown	Q8LDQ8	At5g24165	2	2	2	2



**Table 4.** List of all proteins identified in the nuclei of Col-0 and *cerk1* treated or not with chitosane

	Protein description	Uniprot ID	Water			Chitosan		
			Col-0		cerk1	cerk1	Col-0	
1	Q9SSD2_ARATH F18B13.15 protein	Q9SSD2 (+1)	17	37	56	33	71	44
2	SSG1_ARATH Probable granule-bound starch synthase 1, chloroplastic	Q9MAQ0 (+1)	22	23	18	17	23	21
3	RBL_ARATH Ribulose biphosphate carboxylase large chain	O03042 (+9)	8	15	17	11	25	23
4	GLYM1_ARATH Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial	Q9SZJ5	20	24	23	17	19	22
5	NUA_ARATH Nuclear-pore anchor	A4GSN8 (+2)	14	29	35	19	59	54
6	Q9SYP1_ARATH F9H16.5 protein	Q9SYP1	9	16	48	15	55	52
7	Q9LD60_ARATH Spliceosomal associated protein 130A	Q9LD60	13	20	32	19	32	33
8	FNRL1_ARATH Ferredoxin-NADP reductase, leaf isozyme 1, chloroplastic	Q9FKW6	9	15	15	6	22	19
9	BGL37_ARATH Myrosinase 2	Q9C5C2 (+1)	10	13	15	10	10	16
10	Q9LNC5_ARATH Elongation factor like protein	Q9LNC5 (+2)	5	16	24	11	31	33
11	F4HXV6_ARATH Nucleoporin 155	F4HXV6 (+1)	6	21	32	9	32	33
14	Q9LKU3_ARATH Putative uncharacterized protein T32B20.g	Q9LKU3 (+1)	9	12	18	9	24	29
15	RH2_ARATH DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 2	Q94A52 (+1)	11	14	14	6	21	21
17	D7KH43_ARALL Histone H4	D7KH43 (+4)	5	6	6	6	7	7
18	D7MQU9_ARALL Heat shock protein 93-V	D7MQU9 (+1)	5	10	11	7	30	29
20	D7KI86_ARALL ATLFR2	D7KI86 (+3)	10	6	11	8	12	13
22	Q9STF2_ARATH Protein plastid transcriptionally active 16	Q9STF2 (+1)	2	12	15	12	23	22
23	Q9FMF9_ARATH Nuclear protein-like	Q9FMF9 (+1)	5	12	18	7	21	26
24	NOP58_ARATH Probable nucleolar protein 5-2	Q9MAB3	5	11	14	4	21	21
25	PR19B_ARATH Pre-mRNA-processing factor 19 homolog 2	O22785	9	11	12	6	12	12
26	D7KH11_ARALL Elongation factor 1-alpha	D7KH11 (+7)	5	10	8	8	13	10
27	F4IVZ7_ARATH Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase	F4IVZ7 (+4)	5	9	11	7	16	14
28	ATPA_ARATH ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	P56757	6	11	9	7	13	15
29	C0SVF3_ARATH Putative uncharacterized protein At3g57150	C0SVF3 (+1)	4	10	12	12	17	21
30	Q9SGT7_ARATH At1g56110/T6H22_9	Q9SGT7 (+2)	3	6	14	4	17	18
32	F4I5P3_ARATH MOS4-associated complex 3A	F4I5P3 (+1)	2	5	10	9	16	17
33	EFTU_ARATH Elongation factor Tu, chloroplastic	P17745 (+1)	4	5	7	4	16	13
34	PME3_ARATH Pectinesterase/pectinesterase inhibitor 3	Q49006 (+2)	8	8	8	8	8	10
42	D7MEQ0_ARALL DNA-directed RNA polymerase	D7MEQ0 (+1)	6	8	18	9	17	15
52	PHS2_ARATH Alpha-glucan phosphorylase 2, cytosolic	Q9SD76 (+2)	4	2	10	3	12	12
54	D1861_ARATH Putative DNA-binding protein At1g48610	Q94AD1	8	6	9	6	9	8
55	PER12_ARATH Peroxidase 12	Q96520 (+1)	2	7	8	4	10	7

56	D7LY42_ARALL Putative uncharacterized protein	D7LY42 (+1)	5	8	6	5	10	8	8	7
60	ADT1_ARATH ADP-ATP carrier protein 1, mitochondrial	P31167 (+6)	3	8	8	6	11	12	9	10
61	Q9FJW0_ARATH AT5g7630/K919_20	Q9FJW0	6	7	9	7	13	12	6	12
64	Q56XH2_ARATH Photosystem II chlorophyll-binding protein	Q56XH2 (+4)	4	5	5	2	7	6	5	6
65	RK15_ARATH 50S ribosomal protein L15, chloroplastic	P25873 (+1)	4	3	10	6	10	10	9	10
67	D7LJX0_ARALL 50S ribosomal protein L3	D7LJX0 (+2)	5	5	6	6	12	13	10	11
68	D7LGE8_ARALL Ribosomal protein S5 family protein	D7LGE8 (+3)	2	3	4	3	8	8	9	9
71	O22826_ARATH At2g43770	O22826	4	6	9	4	13	10	10	9
75	Q94F20_ARATH At5g25460	Q94F20 (+1)	7	3	8	3	2	10	9	9
76	D7LQY3_ARALL Putative uncharacterized protein	D7LQY3 (+2)	4	4	5	2	11	8	8	6
77	RJL2A_ARATH U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	P43333	6	8	10	4	8	10	9	5
78	D7M0W5_ARALL ATTIP49A/RIN1	D7M0W5 (+1)	5	6	8	4	14	10	9	5
86	D7KL23_ARALL At1g31330/T19E23_1	D7KL23 (+1)	5	5	5	4	8	5	3	5
91	CAS_ARATH Calcium sensing receptor, chloroplastic	Q9FN48	3	3	11	7	10	11	8	5
93	Q08A56_ARATH At4g15900 OS=Arabidopsis thaliana	Q08A56 (+4)	2	4	8	3	14	10	12	9
98	CPSF1_ARATH Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	Q9FGR0	4	3	12	7	8	16	7	3
100	NUP96_ARATH Nuclear pore complex protein Nup96 homolog	Q8LLD0 (+1)	5	8	10	3	10	11	4	7
104	Q9LT39_ARATH Leucine-rich repeat-containing protein	Q9LT39 (+1)	5	3	3	6	9	8	8	7
105	ARP7_ARATH Actin-related protein 7	Q8L4Y5 (+1)	4	2	9	2	9	7	8	2
107	C3H4_ARATH Zinc finger CCH domain-containing protein 4	Q9LNV5 (+1)	4	2	8	2	12	9	6	6
114	MSI4_ARATH WD-40 repeat-containing protein MSI4	O22607	2	4	5	4	5	4	4	3
117	Q9LYE7_ARATH Putative uncharacterized protein At5g11420	Q9LYE7 (+1)	3	9	4	7	10	3	4	3
121	Q9LSK7_ARATH At3g18035	Q9LSK7	3	4	6	4	6	6	6	6
124	B9DHH1_ARATH Nucleoside diphosphate kinase	B9DHH1 (+2)	3	3	3	3	5	4	5	4
125	FABG_ARATH 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, chloroplastic	P33207 (+2)	3	6	7	2	10	9	6	6
128	PSAN_ARATH Photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic	P49107 (+3)	3	3	4	3	9	4	6	5
129	D7KR08_ARALL Predicted protein	D7KR08 (+1)	5	8	5	4	8	6	7	4
137	D7LBP0_ARALL Non-specific lipid-transfer protein	D7LBP0 (+1)	3	3	3	3	3	3	3	3
144	SPF27_ARATH Pre-mRNA-splicing factor SPF27 homolog	Q949S9	4	4	5	3	9	9	6	6
150	F4HR88_ARATH Leucine-rich repeat (LRR) family protein	F4HR88 (+2)	4	7	8	6	7	8	2	4
167	PSBA_ARATH Photosystem Q(B) protein	P83755	3	5	4	3	4	4	3	3
187	Q93ZE7_ARATH AT3g52500/F22O6_120	Q93ZE7 (+1)	4	5	4	4	4	7	3	3
188	U603_ARATH UPF0603 protein At1g54780, chloroplastic	Q9ZVL6	3	4	3	2	6	6	7	7
205	D7LGQ1_ARALL Putative uncharacterized protein	D7LGQ1 (+4)	2	2	3	3	4	5	4	2
220	Q8L934_ARATH Nucleoid DNA-binding-like protein	Q8L934 (+2)	4	5	5	4	4	3	3	4

## BIBLIOGRAPHY

- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415:977-983.
- Bae, M.S., Cho, E.J., Choi, E.Y., and Park, O.K. 2003. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 36:652-663.
- Berr, A., Menard, R., Heitz, T., and Shen, W.H. 2012. Chromatin modification and remodelling: a regulatory landscape for the control of Arabidopsis defence responses upon pathogen attack. *Cellular microbiology* 14:829-839.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* 60:379-406.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A., and Stacey, G. 2014. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* 3.
- Caplan, J., Padmanabhan, M., and Dinesh-Kumar, S.P. 2008. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell host & microbe* 3:126-135.
- Charron, J.B., Ouellet, F., Houde, M., and Sarhan, F. 2008. The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC plant biology* 8:86.
- Cheng, Y.T., Germain, H., Wiermer, M., Bi, D., Xu, F., Garcia, A.V., Wirthmueller, L., Despres, C., Parker, J.E., Zhang, Y., and Li, X. 2009. Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in Arabidopsis. *The Plant cell* 21:2503-2516.
- Cheng, Z., Li, J.F., Niu, Y., Zhang, X.C., Woody, O.Z., Xiong, Y., Djonovic, S., Millet, Y., Bush, J., McConkey, B.J., Sheen, J., and Ausubel, F.M. 2015. Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature* 521:213-216.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448:497-500.

- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.
- Dong, C.H., Hu, X., Tang, W., Zheng, X., Kim, Y.S., Lee, B.H., and Zhu, J.K. 2006. A putative Arabidopsis nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Molecular and cellular biology* 26:9533-9543.
- Espinosa, A., and Alfano, J.R. 2004. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cellular microbiology* 6:1027-1040.
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., and Zhang, Y. 2008. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell research* 18:1190-1198.
- Germain, H., Houde, J., Gray-Mitsumune, M., Sawasaki, T., Endo, Y., Rivoal, J., and Matton, D.P. 2007. Characterization of ScORK28, a transmembrane functional protein receptor kinase predominantly expressed in ovaries from the wild potato species *Solanum chacoense*. *FEBS Letters* 581:5137-5142.
- Germain, H., Qu, N., Cheng, Y.T., Lee, E., Huang, Y., Dong, O.X., Gannon, P., Huang, S., Ding, P., Li, Y., Sack, F., Zhang, Y., and Li, X. 2010. MOS11: a new component in the mRNA export pathway. *PLoS genetics* 6:e1001250.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M. 1997. USE OF ARABIDOPSIS FOR GENETIC DISSECTION OF PLANT DEFENSE RESPONSES. *Annual Review of Genetics* 31:547-569.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular cell* 5:1003-1011.
- Horiguchi, G., Van Lijsebettens, M., Candela, H., Micol, J.L., and Tsukaya, H. 2012. Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant science: an international journal of experimental plant biology* 191-192:24-34.
- Ito, J., Batth, T.S., Petzold, C.J., Redding-Johanson, A.M., Mukhopadhyay, A., Verboom, R., Meyer, E.H., Millar, A.H., and Heazlewood, J.L. 2011. Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *Journal of proteome research* 10:1571-1582.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.

- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant cell* 16:3496-3507.
- Landry, F., Lombardo, C.R., and Smith, J.W. 2000. A method for application of samples to matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight targets that enhances peptide detection. *Analytical biochemistry* 279:1-8.
- Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M., and Stacey, G. 2007. Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* 20:900-911.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19613-19618.
- Monaghan, J., Germain, H., Weihmann, T., and Li, X. 2010. Dissecting plant defense signal transduction: Modifier of *sncl* in Arabidopsis. *Canadian Journal of Plant Pathology* 32:35-42.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant physiology* 135:1113-1128.
- Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* 75:4646-4658.
- Nitta, Y., Ding, P., and Zhang, Y. 2014. Identification of additional MAP kinases activated upon PAMP treatment. *Plant signaling & behavior* 9:e976155.
- Petutschnig, E.K., Jones, A.M., Serazetdinova, L., Lipka, U., and Lipka, V. 2010. The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in Arabidopsis thaliana and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 285:28902-28911.
- Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Kapetis, D., Zolezzi, F., Piaggese, A., and Perata, P. 2011. Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *Journal of plant research* 124:619-629.

- Rustgi, S., Pollmann, S., Buhr, F., Springer, A., Reinbothe, C., von Wettstein, D., and Reinbothe, S. 2014. JIP60-mediated, jasmonate- and senescence-induced molecular switch in translation toward stress and defense protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:14181-14186.
- Staal, J., Kaliff, M., Dewaele, E., Persson, M., and Dixelius, C. 2008. RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of Arabidopsis to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55:188-200.
- Wan, J., Zhang, X.C., and Stacey, G. 2008a. Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant signaling & behavior* 3:831-833.
- Wan, J., Zhang, X.C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.Y., Stacey, M.G., and Stacey, G. 2008b. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *The Plant cell* 20:471-481.
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D.G., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A., and Kamoun, S. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 77:235-247.
- Zhang, Y., and Li, X. 2005. A putative nucleoporin 96 Is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by suppressor of *nrp1-1*, constitutive 1. *The Plant cell* 17:1306-1316.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428:764-767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125:749-760.

## CHAPITRE III

### CONCLUSION

La réponse de MTI est dépendante de la perception des motifs moléculaires des pathogènes, MAMP et PAMP par des récepteurs extracellulaires, PRR. Après activation, ces récepteurs activent la voie de MAPK. Deux voies de MAPK sont connues pour être impliquées dans la signalisation de MTI. Les criblages génétiques nous ont aidés à bien comprendre les mécanismes de défense chez la plante. Tous les criblages génétiques visent à trouver la base génétique responsable d'un phénotype, mais quand deux ou plusieurs protéines peuvent remplir la même fonction cellulaire et agir de manière redondante, le criblage génétique devient impuissant puisque chacun des mutants simples ne peut pas présenter un phénotype. Malgré l'importance de la MTI, la perturbation intracellulaire qui suit la perception de MAMP et responsable de la reprogrammation transcriptionnelle est encore partiellement inconnue. Identifier les composantes protéiques nucléaires responsables de cette reprogrammation transcriptionnelle requiert une approche indépendante de phénotype. Notre étude n'a pas réussi à identifier des facteurs de transcription qui sont responsables de cette reprogrammation transcriptionnelle, néanmoins nous avons trouvé des protéines de liaison à l'ADN et l'ARN et des protéines ribosomales impliqués dans ce rôle. Nos principaux résultats peuvent être résumés ainsi :

- 1) L'analyse de qRT-PCR en choisissant trois gènes reconnus d'après Libault *et al.* (2007) régulés par le traitement avec la chitine, nous a permis de conclure que notre traitement au chitosane (chitine acétylé) fonctionne très bien parce qu'il a régulé ces gènes (150µg/ml), et le temps de 15 min est suffisant pour avoir des changements au niveau moléculaire.
- 2) L'analyse par immunobuvardage de type western de pureté d'extraits protéiques nucléaires envoyés pour l'analyse protéomique, en utilisant Hsp70, un marqueur cytosolique, et histone 3, un marqueur nucléaire, ont confirmé

l'absence de contaminations cytoplasmiques détectables par Western blot. Malgré toutes les précautions qu'on a prises en compte, les résultats d'analyse protéomique ont montré la présence de contamination par des protéines chloroplastiques, mitochondriales et des protéines du métabolisme primaire.

- 3) L'analyse protéomique a permis d'identifier des protéines impliquées dans la traduction, comme des facteurs d'initiation et d'élongation et des protéines ribosomales. Il est connu que la composition des ribosomes est hétérogène et varie durant le développement des plantes pour assurer une régulation traductionnelle. Alors, ces derniers résultats permettent de conclure que des changements au niveau des sous-unités de ribosomes après la détection des éliciteurs pour engendrer les réponses des MTI.
- 4) Notre étude a permis d'observer des enzymes de modification de l'ADN sont observés d'une façon abondante dans notre étude. Ces enzymes peuvent affecter le remodelage de chromatine et par suite la transcription. Alors, ils pourraient jouer un rôle important dans l'activation ou la répression transcriptionnelle responsable de réponse immunitaire.
- 5) Dans nos observations en réponse au chitosane, une autre famille de protéines, ce sont les protéines de liaison à l'ARN, ont été identifiés. Ce sont des protéines impliquées dans l'épissage, l'export et la maturation de l'ARNm. Ces protéines peuvent participer à la réponse de défense puisqu'un défaut dans ces protéines supprime la réponse basale (zhang and Li, 2005) et la réponse ETI (Germain *et al.*, 2010).
- 6) Beaucoup d'événements moléculaires ont lieu pendant les 15 premières minutes après la perception de MAMP, c'est un point de non-retour sur lequel la cellule est engagée à lancer une reprogrammation transcriptionnelle massive requise pour l'établissement de la réponse basale. Bien que l'accent a été en grande partie sur les voies MAP kinases, nos données indiquent que la réorganisation de ribosome, la modification de l'ADN et la maturation des ARN pourraient jouer un rôle majeur dans la réponse à MAMP.



- 7) Plusieurs facteurs de transcriptions ou protéines régulant la transcription ont été identifiés. Des travaux supplémentaires de génomique fonctionnelle seraient néanmoins nécessaires pour déterminer leur implication précise.

Afin de poursuivre notre étude de système immunitaire basal chez la plante, il paraît judicieux de procéder aux expériences suivantes :

- 1) Vérifier la localisation *in planta* de ces protéines identifiées avant et suite au traitement avec le chitosane, en ayant recours à une protéine de fusion GFP (Green Fluorescent Protein) et en utilisant la méthode de « Gateway », afin de vérifier que notre approche fonctionne bien.
- 2) Il est nécessaire de vérifier si ces protéines interagissent avec d'autres protéines afin de découvrir la voie activant la réponse basale des plantes. La co-immunoprécipitation serait une méthode envisageable ici.
- 3) L'étude de ces composantes est cependant entravée par le fait que l'utilisation de lignées mutantes correspondantes peut afficher des phénotypes pléiotropiques ou montrer de la létalité et donc des approches alternatives devront être utilisées.
- 4) Identifier des cultivars qui ont des hauts niveaux de ces protéines, afin d'avoir des plantes qui expriment naturellement ces protéines plus que d'autres.

En résumé, l'approche proposée par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence qu'il y a énormément le niveau d'activité nucléaire suite à l'induction par les PAMPs. Surprenamment, cette activité est à la fois observée dans les plants *cerkl* et Col-0 traités au chitosane, il s'agit d'un résultat inattendu. Celui-ci peut suggérer une voie de signalisation parallèle à celle dont CERK1 est le premier constituant. Il est surprenant d'observer l'importante représentation de protéines impliquées dans le remodelage de l'ADN, la liaison aux ARN et des constituants structurels des ribosomes. Ces résultats suggèrent, telles que le sous-tend notre hypothèse de départ, que les constituants identifiés à ce jour sont seulement ceux impliqués générant un phénotype

non léthal et que les protéines nouvellement identifiées sont soit : 1) nécessaire au développement de la plante, 2) ont individuellement un impact sur l'immunité trop faible pour être perçu ou 3) qu'ils agissent de façon redondante. Les listes de candidats obtenus ouvrent donc plusieurs pistes à investiguer qui pourraient permettre de générer des plantes plus résistantes à ce type d'infection fongique.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allan, C.R et L.A. Hadwiger: The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental mycology*. 3:285-287, 1979.
- Al-Saleh IA: Pesticides: review. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* [1994, 13(3):151-161], 2007.
- E. Amborabé, A. Aziz, P. Trotel-Aziz, D. Quantinet, L. Dhuicq et V. Guy: Stimulation des défenses naturelles de la vigne. Essais d'emploi du chitosan contre *Botrytis cinerea*. *Phytoma*, 571:26-29, 2004.
- Amborabe' BE, Bonmort J, Fleurat-Lessard P, Roblin G: Early events induced by chitosan on plant cells. *J Exp Bot* 59:2317–2324, 2008.
- Tsuneaki Asai, Guillaume Tena, Joulia Plotnikova, Matthew R. Willmann, Wan-Ling Chiu, Lourdes Gomez-Gomez, Thomas Boller, Frederick M. Ausubel & Jen Sheen: MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*, Vol 415, 28 February 2002.
- Aziz A, Heyraud A, Lambert B: Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* 218:767-774, 2004.
- Rajendra Bari, Jonathan D. G. Jones: Roles of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, Volume 69, Issue 4, pp 473-488, March 2009.
- Benhamou, N., P. J. Lafontaine et M. Nicole: Induction of systemic resistance to fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*. 84:1432-1444, 1994.
- Benhamou, N. et P.J. Lafontaine: Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced structural responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici*. *Planta*. 197: 89-102, 1996.
- Jean-Pierre Berlan : Les OGM sont des plantes pesticides : ils nous conduisent tout droit au désastre. Publié le 18-10-2012.
- Angela Bolis : Le lien entre la maladie de Parkinson et les pesticides officiellement reconnus. *Le Monde*, 2012.

- J.-L. Bonnemain et J.-F. Chollet : L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes.Considérations générales. *C. R. Biologies*, 326:1-7, 2003.
- Chakraborty M, Karun A, Mitra A: Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *J Plant Physiol* 10.1016, 2008.
- Dangl JL, Jones JDG: Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833, 2001.
- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J: Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Mol Plant* 1:423-445, 2008.
- Didier Garriguet, Division de la statistique de la santé Statistique Canada.
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA: Oligogalacturonides and chitosan activate plant defence genes through the octadecanoic pathway. *PNAS* 92:4095-8, 1995.
- J. Ebel et A. Mithofer: Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, 206:335-348,1998.
- EL Gaouth, A., J. Arul, J. Grenier et A. Asselin: Effect of chitosane and other polyanions of chitin deacetylase in *Rhizopus stonolifer*. *Experimental Mycology*. 16 : 173-177, 1992.
- Faoro F, Iriti M: Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. *Caryologia* 60:121-4, 2007.
- Felt, O., Buri, P., & Gurny, R: Chitosan: A unique polysaccharide For drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 979-993, 1998.
- Flor, H.H: Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296, 1971.
- Freepons, D.E: Plant growth regulators derived from chitin. United States Patent. # 4,812,159, 1989.
- T. Gaffney, L. Friedrich, B. Vernooij, D. Nefrotto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessmanet J. Ryals: Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261:754-756, 1993.

Claude Gatignol et Jean claude Étienne : Pesticides et santé, 2007.

Gerald C. Nelson, Mark W. Rosegrant, Jawoo Koo, Richard Robertson, Timothy Sulser, Tingju Zhu, Claudia Ringler, Siwa Msangi, Amanda Palazzo, Miroslav Batka, Marilia Magalhaes, Rowena Valmonte-Santos, Mandy Ewing, et David Lee : Impact sur l'agriculture et coûts de l'adaptation. Institut international de recherche sur les politiques alimentaires IFPRI, 2009.

Giustina, A., & Ventura, P: Weight-reducing regimes in obese subjects: Effects of a new dietary fiber integrator. *Act a Toxicological Therapeutics*, 16,199-214, 1995.

Greenlee AR, Arbuckle TE, Chyou PH., Risk factors for female infertility in an agricultural region. *Epidemiology*. 14(4):429-36, 2003.

Hadwiger, L.A. et J.M. Beckman: Chitosan as a component of pea/*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology*. 66: 205-211, 1980.

Hadwiger, L.A., C. Chiang, S. Victory et D. Horovitz: The molecular biology of chitosan in plant pathogen interaction and its application in the agriculture. *Chitin and Chitosan. Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Application*, Elsevier Applied Science, Amsterdam, pp. 119-138, 1988.

Heinsohn, G. et A. S. Bjorson: Method for treating cotyledonous plants. United States Patent. # 5,726,123,1998.

Hirano, S., T. Yamamoto, M. Hayashi, T. Nishida et H. Unui: Chitinase activity in seeds coated with chitosane derivatives. *Agricultural and biological chemistry*. 54(10): 2719-2720, 1988.

Hoppin J, Umbach D, London S, Alavanja A, Sandler D : Exposition aux pesticides et risque d'asthme en milieu agricole *Eur Respir J*; 30 : 243S, 2007.

Iriti M, Sironi M, Gomarasca S, Casazza AP, Soave C, Faoro F: Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. *Plant Physiol Biochem* 2006; 44:893-900, 2006.

Iriti M, Faoro F: Absciscic acid mediates the chitosan-induced resistance in plant against viral disease. *Plant Physiol Biochem* 46:1106-11, 2008.

Iriti, M., Faoro, F.: Chitosan as a MAMP searching for a PRR. *Plant Signal Behav*. 4(1):66-8, 2009.

- Islas-Flores I, Zuñiga-Aguillar JJ: Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defence-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiol Mol Plant Pathol* .70:130-41, 2007.
- Jamal GA.: Neurological syndromes of organophosphorus compounds. *Adverse Drug React Toxicol Rev*. 16(3):133-70, 1997.
- Jeon, Y.J., Shahidi, F., & Kim, S.K : Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Review International*, 61,159-176, 2000.
- Jeuniaux, C: Chitosan as a tool for the purification of waters. In R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, & G.W. Gooday (Eds.), *Chitin in nature and technology* (pp.551-570). NewYork: Plenum Press, 1986.
- S. Kauffmann, S. Dorey et B. Fritig : Les stratégies de défense. *Pour la Science*, p.116-121, janvier 2001.
- Kauss H: Callose biosynthesis as a  $\text{Ca}^{++}$ -regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *J Cell Sci* 2:89-103, 1985.
- Kauss, H., W. Jeblick et A. Domard: The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*. 178: 385-392, 1989.
- David F.Kendra, Lee A. Hadwiger: Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, Volume 8, Issue 3, Pages 276-281, september 1984.
- O. Klarzynski et B. Fritig: Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 324:953-963, 2001.
- M. Knoester, C. Leendert, L. C. Lanloon, J. Van der Heuvel, J. Hennig, F. J. Bol et J. M. Huub: Ethylene-insensitive tobacco lacks non host resistance against soil-borne fungi. *Plant Biology*, 95:1933-1937, 1998.
- Kurita, K: Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 117-120, 1998.
- Laflamme, P., N. Benhamou, G. Bussière et M. Dessueault: Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany*. 77(10):1460-1468, 1999.

- Laflamme, P: Évaluation du chitosane pour lutter contre la pourriture racinaire causée par *Cylindrocladium floridanum* chez l'épinette noire. Thèse de maîtrise. Faculté de foresterie et de géomatique. Département des sciences du bois et de la forêt. 64 p, 2000.
- LAROUSSE, 1995.
- Lee, S.H., Suh, J.S., Kim, H.S., Lee, J.D., Song, J.S., & Lee, S.K: Evaluation of radiation synovectomy of the knee by means of intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex in patients with rheumatoid arthritis: Results at 4-month follow-up. *Korean Journal of Radiology*, 4, 170-178, 2003.
- P. Leroux : Mode d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *C. R. Biologies*, 326:9–21, 2003.
- P. Leroux : Communication personnelle. (Directeur de recherche INRA Versailles), 2005.
- Lesney, M.S: Polycation-like behaviour of chitosan on suspension-culture derived protoplasts of slash pine. *Phytochemistry*. 29(4):1123-1125, 1990.
- Leuba, J.L. et P. Stossel: Chitosan and other polyamines: antifungal activity and interaction with biological membranes. Chitin in nature and technology. R. Muzzareli, C. Jeuniaux et G.W. Gooday Éd. Plenum Press, New-York, pp. 215-222, 1986.
- Lin W, Hu X, Zhang W, Rogers WJ, Cai W: Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *J Plant Physiol* 162:937-44, 2005.
- Li, T., R. Brzezinski et C. Beaulieu: Enzymatic production of chitosan oligomers. *Plant physiology and Biochemistry*. 33: 599-603, 1995.
- Lizama-Uc G, Estrada-Mota IA, Caamal-Chan MG, Souza-Perera R, Oropeza-Salin C, Zhang, J. & Zhou, J.M. *Molecular Plant* 3, 783-793, 2010.
- Macchi, G: A new approach to the treatment of obesity: Chitosan's effects on body weight reduction and plasma cholesterol levels. *Acta Toxicological Therapeutics*, 27, 303-320, 1996.
- Majeti, N.V., & Kumar, R: A review of chitin and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27, 2000.

- J. Malamy, J. P. Carr, D. Klessig et I. Raskin: Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250:1002-1004, 1990.
- Mesnage R., Defarge N., Spiroux J., Séralini GE.: Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles, BioMed Research International, 2014.
- J.-P. Métraux, H. Signer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum et B. Inverardi: Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250:1004-1006, 1990.
- Ayako Miya, Premkumar Albert, Tomonori Shinya, Yoshitake Desaki, Kazuya Ichimura, Ken Shirasu, Yoshihiro Narusaka, Naoto Kawakami, Hanae Kaku, and Naoto Shibuya. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. Current Issue, Vol. 104 no. 49, 19613-19618, 2007.
- L. Multigner *et al.*: Chlordecone exposure and risk of prostate cancer – J. clin Oncol 28: 3457-3462, 2010.
- Nations Unies. World urbanization prospects, the 2009 revision population database (<http://esa.un.org/wup2009/unup/>).
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., & Azuma, I: Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, 2, 93-99. N-acetylchito-oligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Bio-chemistry*, 57, 405-409, 1984.
- Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S., Nishimura, K., & Azuma, I: Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macrophages by O-(carboxymethyl) chitins. *Carbohydrate Research*, 146, 251-258, 1986.
- Yukino Nitta, Pingtao Ding, Yuelin Zhang: Identification of additional MAP kinases activated upon PAMP treatment. *Plant Signal Behav* 9(11):e976155, 2014.
- Oliva A, Spira A, Multigner L., Contribution of environmental factors to the risk of male infertility, *Hum Reprod*. 16(8):1768-76, 2001.
- Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y. & Shibuya, N: Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. *Plant and cell physiology* 43, 505-512, 2002.



- Orozco-Cardenas, M. et C.A. Ryan: Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 6553-6557, 1999.
- V. Pautot, C. Rabaglia et J-C. Pernellet : La résistance des plantes aux agents pathogènes. *Phytoma*, 521:10-15, 1999.
- Pelletier, J : Effet du chitosane sur la croissance et la germination d'*Ophistoma ulmi* et *O. novo-ulmi* et incidence sur le développement de la maladie hollandaise de l'orme. Projet de fin d'études en biologie forestière, Faculté de foresterie et de géomatique. p. 21, 2000.
- Peniche-Covas, C., Alwarez, L.W., & Arguelles-Monal, W.: The adsorption of mercuric ions by chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 46, 1147-1150, 1987.
- Popp, M.P., M.S. Lesneey et J.M. Davis: Defense responses elicited in pine cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 47:199-206, 1997.
- Rosegrant, M.W., Ringler, C. et Msangi, S. 2008. International model for policy analysis of agricultural commodities and trade (IMPACT): Model description. Washington, DC, IFPRI.
- Rugbjerg K, Harris MA, Shen H, Marion SA, Tsui JK, Teschke K.: Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease - a population-based case-control study evaluating the potential for recall bias. *Scand J Work Environ Health*. 2011 Jan 17.
- Shahidi, F., & Synowiecki, J: Isolation and characterization of nutrients and valueadded products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1527-1532, 1991.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., & Jeon, Y.J: Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37-51 (1999).
- Struszczyk , H. et O. Kivekas: Method for seed incrusting United States Patent. 5,554,445,1996.
- B.E. Tabashnik *et al.*: Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, Vol 31, n°6, pp510-521, juin 2013.
- Tiffany A. Reese, Hong-Erh Liang, Andrew M. Tager, Andrew D. Luster, Nico Van Rooijen, David Voehringer & Richard M. Locksley: Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*, 447, 92-96, 2007.

- Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., & Mikami, T: Protective effect of *N*-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiology and Immunology*, 33, 357-367, 1989.
- K Tsuda, M Sato, T Stoddard, J Glazebrook, F Katagiri: Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLoS genetics*, 2009.
- D. T. Tyler Flockhart , Jean-Baptiste Pichancourt, D. Ryan Norris and Tara G. Martin: Unravelling the annual cycle in a migratory animal: breeding-season habitat loss drives population declines of monarch butterflies. *Journal of Animal Ecology* 84, 155-165, 2015.
- Wang W, Li S, Zhao X, Du Y, Lin B: Oligochitosan induces cell death and hydrogen peroxideaccumulation in tobacco suspension cells. *Pestic Biochem Physiol* 90:106-13, 2008.
- Yamada, A. Shibuya, N., Kodama, O., & Katsuka, T.A: Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitoooligosaccharides, *Bioscience, Biotechnological Biochemistry*, 57, 405-409, 1993.
- Yan, S., Dong, X.: Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 20, pp. 64 - 68, 2014.
- Zipfel C: Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Cur Opin Plant Biol* 12:414–420, 2009.